

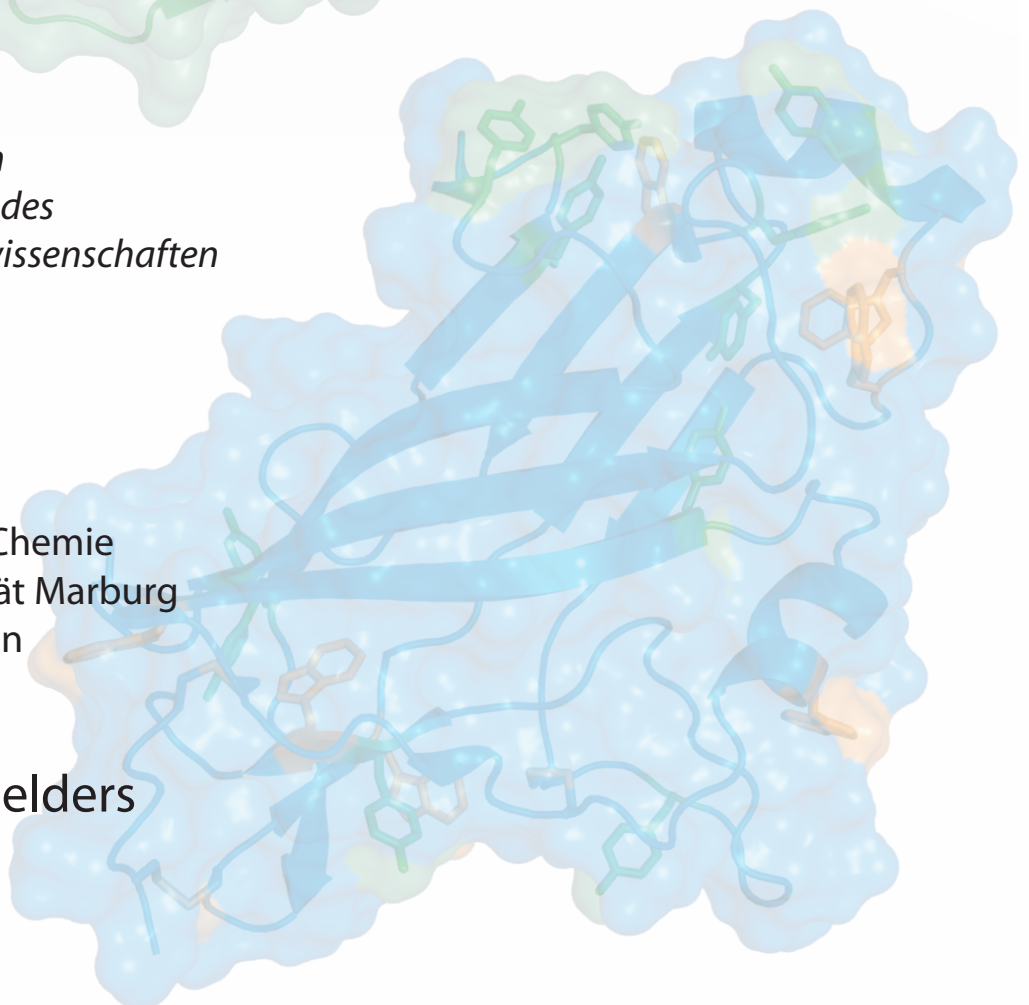
Struktur und Funktion von Flokkulinen aus *Saccharomyces cerevisiae* sowie weiterer pilzlicher Zellwandproteine



*Dissertation
zur Erlangung des
Doktorgrades der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)*

dem Fachbereich Chemie
der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Maik Stefan Veelders



Marburg an der Lahn im Mai 2012

Struktur und Funktion von Flokkulinen aus
Saccharomyces cerevisiae
sowie weiterer pilzlicher Zellwandproteine

Dissertation
zur Erlangung des
Doktorgrades der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

dem
Fachbereich Chemie der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Maik Stefan Veelders
aus
Gronau (Westf.)

Marburg an der Lahn im Mai 2012

Die vorliegende Dissertation wurde unter Betreuung von Herrn Prof. Dr. Lars-Oliver Essen von Juni 2008 bis Mai 2012 am Fachbereich Chemie der Philipps-Universität Marburg angefertigt.

Vom Fachbereich Chemie der Philipps-Universität Marburg (Hochschulkennziffer 1180)

als Dissertation angenommen am: _____

Erstgutachter: Prof. Dr. Lars-Oliver Essen (Fachbereich Chemie, Marburg)

Zweitgutachter: Prof. Dr. Hans-Ulrich Mösch (Fachbereich Biologie, Marburg)

Erklärung

ich versichere, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel

**“Struktur und Funktion von Flokkulinen aus
Saccharomyces cerevisiae
sowie weiterer pilzlicher Zellwandproteine“**

selbständig und ohne fremde Hilfe angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe, Alle vollständig oder sinngemäß übernommenen Zitate wurden als solche gekennzeichnet.

Die Dissertation wurde weder in der jetzigen oder in einer ähnlichen Form bei einer anderen in- oder ausländischen Hochschule anlässlich eines Promotionsgesuchs oder zu anderen Prüfungszwecken eingereicht

Marburg, 03.05.2012

(Maik Veelders)

Wissenschaftlicher Werdegang

Diese Seite enthält persönliche Daten und ist daher nicht Teil der Online-Veröffentlichung.

Publikationen

Veelders M, Brückner S, Ott D, Unverzagt C, Mösch, H-U, Essen L-O, *Structural basis of flocculin-mediated social behavior in yeast*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2010 **107**(52): p. 22511 – 6

Veelders M & Essen L-O, *Complex gadolinium-oxo clusters formed along concave protein surfaces*. In preparation.

Maestre Reyna M, Diderrich R, Veelders M, Eulenburg G, Kalugin V, Brückner S, Keller P, Rupp S, Mösch, H-U, Essen L-O, *Structural code for adhesin-mediated invasion of host epithelia by Candida glabrata*. In preparation.

Konferenzbeiträge

Molecular Life Sciences, 2011

Veelders M, Brückner S, Kock M, Mösch, H-U, Essen L-O, *Structural basis of flocculin-mediated adhesion in yeast*.

Intra- and Intercellular Transport and Communication Symposium, 2011

Veelders M, Brückner S, Ott D, Unverzagt C, Mösch, H-U, Essen L-O, *Structural basis of flocculin-mediated adhesion in yeast*.

CFG PI-Meeting, 2011

Veelders M, Brückner S, Mösch, H-U, Essen L-O, *Structural insights into flocculation of S. cerevisiae*.

Fourth FEBS Advanced Lecture Course Human Fungal Pathogens, 2011,

Veelders M, Maestre Reyna M, Brückner S, Eulenburg G, Mösch, H-U, Essen L-O *Structural insights into flocculation of S. cerevisiae and adhesion of C. glabrata*.

Murnau Conference, 2010,

Veelders M, Brückner S, Ott D, Unverzagt C, Mösch, H-U, Essen L-O, *Structural insights into flocculin-mediated cooperative behavior of Saccharomyces cerevisiae*.

3rd European Conference on Chemistry for Life Sciences (ECCLS), 2009,

Veelders M, Brückner S, Unverzagt C, Mösch, H-U, Essen L-O, *Structural and Functional Investigations on Flo5 from S. cerevisiae*.

In der wwPDB deponierte Proteinstrukturen

Veelders M, Brückner S, Ott D, Unverzagt C, Mösch, H-U & Essen L-O

2XJP	X-Ray Structure of the N-terminal domain of the Flocculin Flo5 from <i>Saccharomyces cerevisiae</i> in complex with calcium and mannose
2XJQ	X-Ray Structure of the N-terminal domain of the Flocculin Flo5 from <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
2XJR	X-Ray Structure of the N-terminal domain of the Flocculin Flo5 from <i>Saccharomyces cerevisiae</i> in complex with calcium and Man5 (D2-D3)
2XJS	X-Ray Structure of the N-terminal domain of the Flocculin Flo5 from <i>Saccharomyces cerevisiae</i> in complex with calcium and α 1,2-mannobiose
2XJT	X-Ray Structure of the N-terminal domain of the Flocculin Flo5 from <i>Saccharomyces cerevisiae</i> in complex with calcium and Man5 (D1)
2XJU	X-Ray Structure of the N-terminal domain of the Flocculin Flo5 from <i>Saccharomyces cerevisiae</i> with mutation S227A in complex with calcium and α 1,2-mannobiose
2XJV	X-Ray Structure of the N-terminal domain of the Flocculin Flo5 from <i>Saccharomyces cerevisiae</i> with mutation D202T in complex with calcium and glucose

Veelders M & Essen L-O

4AHW	Flo5A showing a heptanuclear gadolinium cluster on its surface
4AHX	Flo5A showing a trinuclear gadolinium cluster on its surface
4AHY	Flo5A cocrystallized with 3 mM GdAc3
4AHZ	Flo5A showing a heptanuclear gadolinium cluster on its surface after 60 min of soaking
4AI0	Flo5A showing a heptanuclear gadolinium cluster on its surface after 9 min of soaking
4AI1	Flo5A showing a heptanuclear gadolinium cluster on its surface after 19 min of soaking
4AI2	Flo5A showing a heptanuclear gadolinium cluster on its surface after 41 min of soaking
4AI3	Flo5A showing a heptanuclear gadolinium cluster on its surface after 60 min of soaking

Maestre Reyna M, Diderrich R, Veelders M, Eulenburg G, Kalugin V, Brückner S, Keller P, Rupp S, Mösch, H-U & Essen L-O

- 4AF9** Crystal Structure of Epithelial Adhesin 1 A domain (Epa1A) from *Candida glabrata* in complex with Galb1-3Glc
- 4AFA** Crystal Structure of subtype-switched Epithelial Adhesin 1 to 2 A domain (Epa1to2A) from *Candida glabrata* in complex with glycerol
- 4AFB** Crystal Structure of subtype-switched Epithelial Adhesin 1 to 3 A domain (Epa1to3A) from *Candida glabrata* in complex with glycerol
- 4AFC** Crystal Structure of subtype-switched Epithelial Adhesin 1 to 6 A domain (Epa1to6A) from *Candida glabrata* in complex with Galb1-3Glc

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	1
Summary	3
1. Einleitung	5
1.1 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> und weitere Hefen der Familie Saccharomycetaceae.....	5
1.2 Die Hefezellwand	6
1.3 Adhäsine	7
1.3.1 Flokkuline in <i>S. cerevisiae</i>	8
1.3.2 Regulation der Flokkuline in <i>S. cerevisiae</i>	9
1.4 PA14-Domänen Adhäsine	9
1.4.1 Die PA14-Domäne	9
1.4.2 Flokkuline des Flo5/PA14-Flokkulin-Typs	11
1.4.3 Epitheliale Adhäsine in <i>Candida glabrata</i>	11
1.4.4 PA14-Adhäsine aus anderen Organismen	12
1.5 Flo11-Domänen-Adhäsine	12
1.5.1 Phänotypen der Expression von <i>S. cerevisiae</i> Flo11	13
1.6 Das Zellwandprotein Sun4	14
1.7 Zielsetzung.	16
2 Material	17
2.1 Geräte	17
2.2 Verbrauchsmaterialien	18
2.3 Chemikalien	19
2.4 verwendete Saccharide und Oligosaccharide	20
2.5 Enzyme	20
2.6 Klonierungsprimer	21
2.7 verwendete Vektoren.....	21
2.7.1 pCR 2.1-TOPO-Vektor	21
2.7.2 pET-28a(+)-Vektor.....	22
2.8 verwendete Bakterienstämme	22
2.8.1 <i>E. coli</i> TOP10F'	22
2.8.2 <i>E. coli</i> DH5a.....	22
2.8.3 <i>E. coli</i> Origami2 (DE3)	22
2.8.4 <i>E. coli</i> SHuffle T7 Express.....	23
2.9 verwendete Konstrukte.....	23
3 Methoden.....	24
3.1 Molekularbiologische Methoden.....	24
3.1.1 Polymerasekettenreaktion (PCR)	24
3.1.2 Agarosegelelektrophorese	25
3.1.3 Klonierung.....	26
3.2 Proteinchemische Methoden	27
3.2.1 Überexpression von rekombinanten pilzlichen Proteindomänen.....	27
3.2.2 Löslichkeitsstudien an Flo5A Varianten und zuvor nicht charakterisierten Flokkulinen.....	27
3.2.3 Expressionen von Selenomethionin-markiertem Proteinen	28
3.2.4 Zellaufschluss im präparativen Maßstab	29
3.2.5 Chromatographische Aufreinigung	29
3.2.6 Konzentration von Protein durch Ultrafiltration	30
3.2.7 Pufferwechsel	30
3.3 Analytische Methoden.....	31

3.3.1 SDS-PAGE.....	31
3.3.2 Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen.....	32
3.3.3 CD-Spektroskopie	33
3.3.4 Fluoreszenz-Spektroskopie	33
3.3.5 Fluoreszenzmarkierung mit AlexaFluor-488-TFP oder -SDP	34
3.3.6 CFG-Analysen.....	34
3.4 Methoden zur Bestimmung der dreidimensionalen Struktur von Proteinen.....	35
3.4.1 Kristallisationsscreening	36
3.4.2 Optimierung der Proteinkristallisation	37
3.4.3 Microseeding	37
3.4.4 Vorbereiten der Kristalle	38
3.4.5 <i>Soaking</i> von Kristallen mit Schwermetallen	38
3.4.6 <i>Soaking</i> von Kristallen mit potentiellen Kohlenhydrat-Liganden.....	38
3.4.7 Röntgenbeugung.....	39
3.4.8 Prozessierung	40
3.4.9 Strukturlösung – Bestimmung der Phasen	40
3.4.10 Verfeinerung.....	43
3.4.11 Darstellung der Strukturen	43
4 Ergebnisse	44
4.1 Struktur und Funktion der Flo5A-Domäne	45
4.1.1 Klonierung der Expressionskonstrukte von Flo5A und Flo5A-Varianten.....	45
4.1.2 Produktion und Aufreinigung von Flo5A und Flo5A-Varianten	45
4.1.3 Kristallisation der Flo5A-Domäne	46
4.1.4 Phasierung von Flo5A durch SIRAS	47
4.1.5 Atomare Struktur des Flo5A C-Typ-Lektins	48
4.1.6 Sekundäre Kohlenhydrat-Bindungstasche	50
4.1.7 Vergleich von Flo5A mit anderen PA14-Domänen-haltigen Proteinen	51
4.1.8 Die trigonale Kristallform von Flo5A.....	53
4.2 Untersuchung der Bindungsspezifität von Flo5A	53
4.2.1 Glykan-Bindung durch die Flo5A-Domäne.....	54
4.2.2 Quantifizierung der Flo5A-Glykan Wechselwirkungen	56
4.3 Analyse von Mutanten des Flo5A-Lektins.....	57
4.3.1 D160A/D161A	57
4.3.2 N224A	57
4.3.3 Y222F.....	58
4.3.4 S227A.....	59
4.3.5 Q98A	61
4.3.6 D202T.....	62
4.4 Gadolinium-Cluster auf der Flo5A-Oberfläche	64
4.5 Struktur und Funktion von LgFlo1A.....	66
4.6 Struktur und Funktion von Epa1A	67
4.6.1 Lösung über Molecular Replacement	67
4.6.2 Struktur.....	69
4.7 Struktur und Funktion von Flo11A	69
4.7.1 Produktion und Aufreinigung von Flo11A und Σ Flo11A.....	70
4.7.2 Kristallisation von Flo11A	70
4.7.3 Strukturlösung von Flo11A über <i>Multi-wavelength anomalous dispersion</i>	72
4.7.4 Die Struktur der Flo11A-Domäne.....	75
4.7.5 CD-Spektroskopie Flo11A und Σ Flo11A	76
4.8 Substratspezifität von Flo11A und Σ Flo11A	77
4.8.1 Analyse der Flo11A- und Σ Flo11A-Substratspezifität durch das CFG	77

4.8.2 <i>Soaking</i> Experimente mit Flo11A-Kristallen	77
4.9 Struktur von Sun4-C	78
4.9.1 Klonierung und Aufreinigung	78
4.9.2 Kristallisation	79
4.9.3 Phasierung der Sun4-C-Struktur durch SAD	80
4.9.4 Die Struktur von Sun4-C	81
4.9.5 Substratspezifität von Sun4-C	82
5. Diskussion	83
5.1 Flo5A – Struktur und Funktion	84
5.1.1 Die Struktur von Flo5A	84
5.1.2 Die Bindungstasche von <i>S. cerevisiae</i> Flokkulinen	85
5.1.3 Flokkulin-ähnliche Domänen in anderen Spezies	87
5.1.4 Die Kohlenhydrat-Spezifität von Flo5A und dessen Varianten	87
5.1.5 Vergleich der Affinitäten von Flo5A mit den Flokkulinen Flo1A und LgFlo1A	89
5.1.6 Flo5A als <i>Greenbeard</i> -Gen	90
5.2 Die Adhäsion-Domäne von Epa1	92
5.2.1 Vergleich der Adhäsion-Domänen von Flo5 und Epa1	92
5.2.2 Vergleich der Kohlenhydrataffinität von Flo5A und Epa1A	93
5.2.3 Ausblick	94
5.3 Struktur und Funktion von Flo11A	95
5.3.1 Vergleich von Flo11A und Σ Flo11A	95
5.3.2 Vergleich von Flo11A mit anderen Flo11-Domänen	97
5.3.3 Grenzen der Flo11A-Domäne	98
5.3.4 Flo11A bindet keine Glycane	99
5.3.5 Modell für eine homotypische Flo11A-Flo11A-Interaktion	99
5.3.6 Hydrophobizität als Interaktionsmechanismus von Flo11A	101
5.3.7 Ausblick	103
5.4 Struktur und Funktion von Sun4 aus <i>S. cerevisiae</i>	103
5.4.1 Vergleich mit anderen Sun-Domänen enthaltenden Proteinen	103
5.4.2 Die Struktur von Sun4-C	104
5.4.3 Ein möglicher Glucanase-Mechanismus für Sun4	106
5.4.4 Ausblick	107
5.5 Bildung eines Gadolinium-Oxo-Clusters in einer sauren Tasche der Flo5A-Oberfläche	107
5.5.1 Zwei verschiedene Formen der Gadoliniuminkorporation in Flo5A	107
5.5.2 Zuordnung der Flo5A Gadoliniumcluster zu Kleinmolekülclustern	108
5.5.3 Ausblick auf die biomedizinische Relevanz des Gd-Oxo-Clusters	110
5.6 Ausblick	110
6 Literatur	112
7 Anhang	123
7.1 Kristallographische Statistiken	123
7.1.1 Datensammlungs- und Verfeinerungsstatistiken <i>Soaking</i> -Experimente zur Glykanspezifität von Flo5A	123
7.1.2 Datensammlungs- und Verfeinerungsstatistiken deponierter Flo5A-Strukturen	124
7.1.3 Datensammlungs- und Verfeinerungsstatistiken Flo5A-Mutanten	125
7.1.4 Datensammlungs- und Verfeinerungsstatistiken Flo5A-Gadolinium-Cluster	126
7.1.5 Datensammlungs- und Verfeinerungsstatistiken Flo11A <i>Soaking</i> -Experimente	127
7.2 ESI-TOF-Daten Flo11A-SeMet	128
7.3 produzierte und analysierte Proteine	129

7.3.1 Flo5A.....	129
7.3.2 Epa1A.....	129
7.3.3 LgFlo1A	129
7.3.4 Flo11A.....	130
7.3.5 Σ Flo11A	130
7.3.6 Sun4-C.....	130
7.4 Abkürzungen	131
8 Danksagung.....	132

Zusammenfassung

Die Zellwand ist die primäre Interaktionsfläche von Hefezellen mit ihrer Umwelt. Sie besteht in ihrer inneren Schicht aus Chitin, β 1,3- und β 1,6-Glucanen, die für ihre Stabilität entscheidend sind. In der äußeren Schicht der Hefezellwand finden sich verschiedene Glycoproteine, die für die Erkennung und Bindung von Zellen untereinander und die Interaktion mit ihrer weiteren Umgebung notwendig sind. Der Aufbau und Umbau der Zellwand selbst während des Zellzyklus der Hefe ist ein essentieller Vorgang, in den ebenfalls verschiedene Proteine, die in der Zellwand vorkommen und Glucane prozessieren, involviert sind.

In dieser Arbeit wurden Adhäsine und das innere Zellwandprotein Sun4 aus der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* und der humanpathogenen Hefe *Candida glabrata* strukturell und funktionell untersucht. Die untersuchten pilzlichen Adhäsine Flo5, Flo11 und Epa1 vermitteln vegetative Adhäsion der Hefen entweder an weitere Hefezellen, abiotische Substrate oder Wirtszellen. Sie bilden eine Familie mit einer gemeinsamen Superstruktur, die aus einer adhäsionsvermittelnden, N-terminalen A-Domäne, einer mittleren, hochglycosylierten B-Domäne und einer C-terminalen C-Domäne mit Glycosylphosphatidylinositolanker besteht. In dieser Arbeit war es möglich, die molekularen Strukturen der adhäsionsvermittelnden Domänen Flo5A, Epa1A und Flo11A bei atomaren Auflösungen (0.89-1.5 Å) zu bestimmen. Dabei wurde deutlich, dass die mit der PA14-Domäne aus dem Anthrax-protectiven Antigen verwandten A-Domänen von Flo5 und Epa1 eine C-Typ-Lektin-artige Aktivität aufweisen und Glycanstrukturen auf anderen Hefezellen (Flo5A) oder Wirtszellen (Epa1A) binden. Native, für die biologische Funktion relevante Liganden konnten in den Strukturen beobachtet und Bindungskonstanten bestimmt werden. Die Flo11A-Domäne zeigt einen vollständig neuen Faltungstyp, offenbarte ihre Ligandspezifität jedoch nicht durch strukturelle Untersuchungen. Allerdings konnte ein lektinartiger Mechanismus ausgeschlossen und ein auf aromatischen Bändern beruhender, homotypischer Mechanismus vorgeschlagen werden.

Die Struktur der in Pilzen hochkonservierten C-terminalen SUN-Domäne des inneren Zellwandproteins Sun4 aus *S. cerevisiae* konnte ebenfalls in atomarer Auflösung aufgeklärt und Hinweise auf eine β -Glucanase Aktivität dieser Domäne gefunden werden. Durch strukturbasiertes Design sollte die Entwicklung von fungiziden Medikamenten gegen diese in Pilzen ubiquitäre, aber exklusiv vorkommende Domäne möglich sein.

Ein heterotypischer Gadolinium-Oxo-Supercluster, der während der Phasierung auf der Oberfläche von Flo5A beobachtet wurde, könnte als Templat für die Inkorporation von Gadolinium in verschiedene Proteine und so langfristig für die Entwicklung eines biokompatiblen und gewebespezifischen MRT-Kontrastmittels dienen.

Summary

The yeast cell wall is the primary interaction interface of yeast cells with their environment. It consists of an inner layer with chitin, β 1,3- und β 1,6-glucans, which are crucial for the cell-wall's stability. In the outer cell-wall layer there are different glycoproteins, which are necessary to recognize and bind other cells or to interact with the environment. The assembly and remodeling of the cell-wall is a crucial process during the cell-cycle, which is governed by glucan-processing proteins located in the cell-wall.

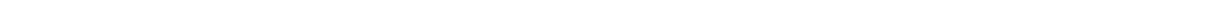
In this thesis, structural and functional aspects of adhesins and the inner-cell-wall protein Sun4 from the brewer's yeast *Saccharomyces cerevisiae* and the human pathogen *Candida glabrata* were analyzed. The fungal adhesins Flo5, Flo11 and Epa1 mediate vegetative adhesion of yeast-cells, either to other yeast cells or to abiotic substrates or host cells. They form a structural family by showing a common superstructure comprising of an N-terminal adhesive A-domain, a middle highly glycosylated B-domain and a C-terminal C-domain with a glycosylphosphatidylinositol-anchor-site.

In this thesis, the molecular structures of the adhesion-mediating domains Flo5A, Epa1A and Flo11A were determined at an atomic resolution (0.89-1.5 Å). Through this, it became clear, that the A-domains of Flo5 and Epa1, which are related to the PA14-domain from the anthrax-protective-antigen, exhibit a C-type-lectin-like activity and recognize glycan structures on the surface of other yeast cells (Flo5) or on the surface of host cells (Epa1). Native, biologically relevant ligands could be observed in the structures and binding affinities could be determined.

The Flo11A domain exhibits a completely novel fold, however, the ligand specificity could not be clearly determined by means of structural analysis. Nevertheless, a C-type-lectin-like mechanism could be excluded for Flo11A and a homotypic interaction mode, based on aromatic bands, could be proposed.

The structure of the highly conserved fungal SUN domain, which can be found on the C-terminus of Sun4 from *S. cerevisiae*, was determined at an atomic resolution as well. The conservation pattern of different amino acids hinted to a β -glucanase activity of this domain. This paves the route to develop anti-fungal pharmaceuticals by structure-based design against this domain occurring exclusively but ubiquitously in fungi.

A heterotypic gadolinium-oxo-supercluster, which was observed during phasing on the surface of Flo5A, could serve as a template for incorporation of gadolinium in other proteins and might be a paradigm for the development of biocompatible and tissue-specific MRI contrast agents.



1. Einleitung

1.1 *Saccharomyces cerevisiae* und weitere Hefen der Familie Saccharomycetaceae

Saccharomyces cerevisiae ist ein eukaryotischer Modellorganismus aus der Familie Saccharomycetaceae, der sowohl in der biologischen Grundlagenforschung, der Biotechnologie, als auch in der Herstellung von fermentativen Nahrungsmittel-Produkten wie Bier, Wein, Brot und in neuerer Zeit auch Bioethanol und verschiedenen Kleinmolekülmetaboliten eingesetzt wird. Dadurch, dass *S. cerevisiae* frühzeitig für molekularbiologische Methoden verfügbar war^[1], entwickelte sich diese, den Hefen zuzurechnende Pilzart, zum wichtigsten eukaryotischen Modellorganismus in der Biologie. So war auch das *S. cerevisiae* Genom das erste eukaryotische Genom, das sequenziert wurde^[2]. In der Produktion von Brot, Bier und Wein wird *S. cerevisiae* seit prähistorischer Zeit eingesetzt, auch wenn die Inokulation der verschiedenen Vorprodukte früher durch Zufall geschah. Die erste Brauhefe in Reinkultur wurde von E.C. Hansen 1833 isoliert^[3] und ist als *Saccharomyces pastorianus* oder *Saccharomyces carlsbergensis* bekannt. Im Jahr 2011 wurde gefunden, dass diese Spezies eine Kreuzung aus *S. cerevisiae* und *Saccharomyces eubayanus* ist, einer kältetoleranten Hefe, die in Scheinbuchenwäldern in Patagonien gefunden wurde^[4]. *Candida glabrata* und *Candida albicans* entstammen ebenfalls der Familie Saccharomycetaceae und sind die in Menschen am häufigsten gefundenen pilzlichen Pathogene^[5]. Bei gesunden Menschen treten sie als Kommensalen auf und führen nur selten beziehungsweise sehr begrenzt zu Infektionen^[6]. In immunkompromittierten Menschen, wie AIDS-Patienten oder anderen schwer Kranken werden *Candida*-Infektionen dagegen zu einem immer größeren Problem. Dies äußert sich auch darin, dass mittlerweile 8-10% der nosokomialen Infektionen auf *Candida*-Spezies zurückgehen^[7]. In Intensivstationen sind *Candida*-Infektionen die dritthäufigste Ursache für systemische Infektionen und weisen dann eine Mortalitätsrate von 47% auf^[8]. Diese starke Prävalenz für Infektionen in Kliniken liegt nicht zuletzt an der Fähigkeit von *Candida*-Spezies Biofilme auf inerten Oberflächen auszubilden, wofür in *C. glabrata* die Adhäsingene *EPA6* und *EPA7*^[9] und in *C. albicans* die *ALS*-Gene verantwortlich gemacht werden^[10].

1.2 Die Hefezellwand

Die Zellwand von *S. cerevisiae* besteht aus zwei Schichten. Die innere Schicht ist für die mechanische Stabilität zuständig^[11, 12], sie besteht zu großen Teilen aus β -1,3-Glucanen und Chitin (poly-GlcNAc- β -1,4-GlcNAc) und zeigt einen Trockengewichtsanteil an der Zellwand von 50 - 60%^[13]. Die innere Schicht zeigt eine Dicke von 70 – 100 nm^[14] und bildet die Anknüpfungsstelle für Zellwandproteine, die sich in der äußeren Schicht befinden. Dies sind unter anderem die Agglutinine und Flokkuline, die hoch mannosyliert sind und so eine ebenfalls größtenteils geschlossene Schicht darstellen (Abbildung 1.1), die in Brauhefen bis zu 200 nm dick werden kann^[15]. Diese Glycoproteine machen einen Trockengewichtsanteil von 35 - 40% an der gesamten Zellwand aus. Die Proteine der äußeren Schicht sind entweder direkt an β -1,3-Glucane geknüpft oder über β -1,6-Glucane mit diesen verbunden und in Zell-Zell-Erkennung und anderen Effekten involviert^[16, 17]. Außerdem limitieren sie den Zugang von zellwandabbauenden Enzymen zur inneren Zellwand. Auch die in dieser Arbeit untersuchten Adhäsine finden sich in der äußeren Zellwand^[18].

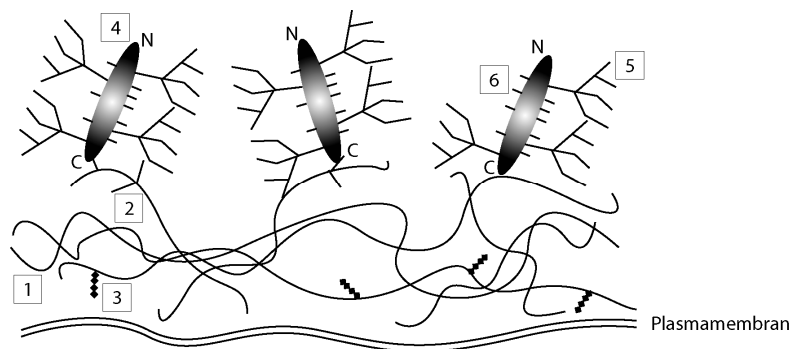


Abb.1.1: Aufbau der Saccharomycetaceae-Zellwand. 1 β -1,3-Glucan, 2 β -1,6-Glucan, 3 Chitin, 4 Proteine die über Reste eines GPI-Ankers kovalent an β -1,6-Glucane gebunden sind, 5 N-Glycosylierung eines Glycoproteins, 6 O-Glycosylierung eines Glycoproteins. Adaptiert nach ^[19].

Die Zellwände von *C. glabrata* und *C. albicans* zeigen einen sehr ähnlichen Aufbau^[20]. Dies äußert sich dadurch, dass *S. cerevisiae* durch Expression von EPA-Genen aus *C. glabrata* in die Lage versetzt wird, menschliche Epithelzellen zu binden. Der restliche Aufbau der Zellwand muss also den Einbau und die Aktivität der Epa-Proteine zulassen^[21]. Allerdings zeigen neuere Studien, dass der Anteil an Zellwandproteinen um bis zu 50% höher ist und somit auch der Mannosidanteil der Zellwand höher liegt^[22].

Schon die Zellwand von *Schizosaccharomyces pombe*, die ebenfalls zu den Ascomyceten aber zur Familie der *Schizosaccharomycetaceae* gehört, enthält einen beträchtlichen Anteil an α -1,3-Glucanen^[12] und unterscheidet sich so von den Zellwänden der hier untersuchten Hefen.

1.3 Adhäsine

In *S. cerevisiae* und ihren Verwandten kommen verschiedene Typen von Adhäsinen in der Zellwand vor. Zum einen gibt es die in die sexuelle Fortpflanzung involvierten Proteine Aga1 und Aga2, Fig2 und Sag1. Diese vermitteln die sexuelle Aggregation der unterschiedlichen Zelltypen α und a durch heterotypische Protein-Protein Interaktion. Die α -Zellen produzieren Aga1, Fig2 und Sag1, während a -Zellen Aga1, Aga2 und Fig2 produzieren. Aga1 kann nun direkt mit Fig2 interagieren oder unter der Vermittlung von Aga2 mit Sag1^[23]. Auf diese Weise wird sichergestellt, dass sich Hefezellen unterschiedlichen Geschlechts paaren.

Zum Anderen gibt es die vegetative Aggregation, diese wird in *S. cerevisiae* durch die Flokkuline Flo1, Flo5, Flo9, Flo10 und Flo11 ausgelöst^[24], aber auch die sexuellen Agglutinine Aga1 und Fig2 können, sofern sie stark genug produziert werden, zu vegetativer Aggregation von Hefezellen führen^[25, 26]. Die Flokkuline aus *S. cerevisiae*, die epithelen Adhäsine (Epa) aus *C. glabrata* und die Agglutinin-ähnlichen-Proteine (Als) aus *C. albicans*, die zu den vegetativen Adhäsinen gehören, zeigen eine ähnliche Domänenstruktur und bilden somit eine strukturelle Superfamilie (Abbildung 1.2)^[27, 28].



Abb.1.2: Domänenstruktur der Adhäsine-Superfamilie aus *S. cerevisiae*, *C. glabrata* und *C. albicans*^[29]. Am N-Terminus befindet sich eine Signalsequenz, die den Export des Flokkulins auf die Zellwand bewirkt. Die A-Domäne vermittelt die adhäsive Aktivität, die serin- und threoninreiche, repetitive B-Domäne sorgt für die Präsentation der A-Domäne außerhalb der Glycocalix, die C-Domäne, die eine Bindungsstelle für einen GPI-Anker enthält, verankert das Adhäsine in der Zellwand.

Die A Domäne enthält in dieser Superfamilie die aktive Gruppe, die eine lektinartige oder anders geartete Adhäsionsfunktion ausüben kann. Bis vor kurzem war keine Struktur einer A-Domäne bekannt. Nachdem die in dieser Arbeit aufgeklärte Struktur von Flo5A 2010 publiziert wurde^[30], folgte in 2011 die A-Domäne des *C. albicans* Adhäsins Als9. Diese Domäne verfügt über die Fähigkeit, bestimmte Proteine sowie freie C-Termini von Proteinen auf der Zellwand einer Wirtszelle zu binden^[31].

Die Funktion der B-Domäne ist nicht vollständig geklärt. Ursprünglich war davon ausgegangen worden, dass diese Domäne, die sehr serin- und threoninreich ist, durch die O-Glycosylierung Calciumionen koordiniert und so eine halb-rigide, stabähnliche Konformation annimmt. Auf diese Weise kann die ligandbindende A-Domäne außerhalb der Glycocalix der

Zelle präsentiert werden und dort andere Zellen oder abiotische Substrate binden^[32]. In neueren Arbeiten wurden durch bioinformatische Studien Hinweise darauf gefunden, dass es in der B-Domäne verschiedener Adhäsine Amyloid-bildende Sequenzen gibt^[33]. In Als-Proteinen wurde die Entfaltung der möglichen Amyloide mittels Rasterkraftmikroskopie (AFM) verfolgt^[34]. Diese Amyloide könnten für ein Zusammenlagern der B-Domänen innerhalb der Glycocalix sorgen und somit eine Aviditätssteigerung der A-Domänen erreichen.

Die C-Domäne enthält eine Bindungsstelle für einen Glycosylphosphatidylinositol-Anker (GPI-Anker), der das exportierte Adhäsins zunächst in der Zellwand verankert. Im Anschluss wird dieser Anker abgespalten und die C Domäne durch eine Transglycosylierung kovalent an β -1,6-Glucane, einen integralen Bestandteil der Hefezellwand gebunden^[12, 35].

1.3.1 Flokkuline in *S. cerevisiae*

Die Funktionsweise von Flokkulinen in *S. cerevisiae* kann zum einen als Modell für andere Adhäsine, zum Beispiel in pathogenen Hefen dienen, zum anderen sind Flokkuline aber auch relevant für Fermentationsprozesse in der Industrie. In der Kunst des Bierbrauens werden schon seit langem untergärige Hefen eingesetzt, die nach Abschluss der Vergärung flokkulieren und sedimentieren und somit eine kostengünstige Methode darstellen, die Hefe von ihrem Fermentationsprodukt zu trennen^[36]. Auch bei der Flaschenvergärung von Sekt kommen flokkulierende Hefen häufig zum Einsatz^[37]. Neuere Anwendungen beziehen sich auf die Produktion von Insulin^[38] oder anderen Kleinmolekül-Metaboliten^[39, 40], sowie auf die Reinigung industrieller oder kommunaler Abwässer^[41, 42].

Die Interaktionen, die von Flokkulinen in *S. cerevisiae* vermittelt werden, können in zwei Klassen aufgeteilt werden. Zum einen die lektinähnliche Flokkulation, die sich durch Zugabe von Zuckern inhibieren lässt und zum anderen die Zucker-insensitive Flokkulation^[43]. Die durch Zucker inhibierbare Flokkulation wiederum ist in den Flo1-Typ, der sich nur durch die Zugabe von Mannose inhibieren lässt und in den *NewFlo*-Typ, der in Braustämmen vorkommt und zusätzlich noch durch Glucose, Maltose und Saccharose inhibierbar ist, unterteilt^[44]. Der Flo1-Typ wird dabei durch die Expression der stark homologen Gene *FLO1*, *FLO5* oder *FLO9* ausgelöst, wohingegen der *NewFlo*-Typ auf dem weiter entfernt verwandten Gen *LgFLO1* beruht^[26, 44, 45].

Über eine weitere Flokkulierungsgruppe, die Mannose-insensitive und calciumunabhängige Flokkulation zeigen soll, wird spekuliert^[46], diese wird eventuell durch das Flokkulin Flo11 vermittelt^[47]. Interessanterweise wurde eben dieses Protein wurde allerdings in einem nahen

Verwandten von *S. cerevisiae*, *Saccharomyces diastaticus*, in dem es sequenzgleich vorliegt, für Mannose-inhibierbare und calciumabhängige Flokkulation verantwortlich gemacht^[48, 49].

1.3.2 Regulation der Flokkuline in *S. cerevisiae*

Die Flokkuline *FLO1*, *FLO5*, *FLO9* und *FLO10* sind ebenso wie die *EPA*-Gene aus *C. glabrata* subtelomer lokalisiert, was einen Einfluss auf ihre Regulierung durch *silencing* und auf ihre Varianz durch interchromosomale Rekombination haben kann^[29, 45, 50]. Die epigenetische Regulation ermöglicht es Hefen, auch innerhalb einer klonalen Population verschiedene Zell-Oberflächen-Adhäsine zu präsentieren und sich so optimal an verschiedene Umgebungen anzupassen^[51]. Die repetitiven B-Domänen aller Flokkuline sind genetisch instabil und können durch *slippage* der DNA-Polymerase während der Replikation kürzer oder länger werden, was die Stärke der Flokkulation beeinflusst^[29].

Während über die Regulation der Flokkuline Flo1, Flo5, Flo9 und Flo10 sonst wenig bekannt ist, abgesehen davon, dass Flokkulation in der späten exponentiellen oder der stationären Phase auftritt, wenn ein Großteil der Kohlenhydrate des Nährmediums aufgebraucht ist^[52, 53], ist die Regulation von Flo11 sehr viel besser erforscht. Dies liegt auch daran, dass *FLO11* einen der am stärksten regulierten Promotoren in *S. cerevisiae* aufweist. Der *FLO11*-Promotor hat eine Länge von über 3000 Basen und enthält viele Regulationsmöglichkeiten, sowohl zur Aktivierung als auch zur Reprimierung^[48, 54]. Phänotypisch ist die Produktion von Flo11 vor allen Dingen abhängig von Stressfaktoren und Nahrungsverfügbarkeit^[43, 55].

1.4 PA14-Domänen Adhäsine

In *S. cerevisiae* sind die A-Domänen der Flokkuline Flo1, Flo5, Flo9 und Flo10 der PA14-Domäne zugeordnet worden, in *C. glabrata* alle Epa-Adhäsine sowie das Adhäsın Pwp7^[27, 56]. In *C. albicans* wurden jedoch keine PA14-Domänen-haltigen Adhäsine gefunden.

1.4.1 Die PA14-Domäne

Die Struktur der PA14-Domäne wurde 1997 als Teil des protektiven Antigens (PA) des Anthrax-Toxins aufgeklärt^[57]. Sie ist ein Teil des Propeptids, das zur Reifung des protektiven Antigens abgespalten wird, der Name PA14 erklärt sich durch ihr Molekulargewicht von 14 kDa. Die PA14-Domäne zeigt ein β -Sandwich das aus zwei antiparallelen β -Faltblättern aus vier und sechs β -Strängen aufgebaut ist. Durch einen Sequenzvergleich wurde festgestellt, dass die PA14 Domäne häufig in Proteinen wie β -Glucosidasen, anderen Glycosidasen, Glycosyltransferasen und Adhäsinen vorkommen, also in Proteinen, die in Kohlenhydratbindung oder -prozessierung involviert sind. Aus weiterer Analyse des

Sequenzvergleichs wurde aufgrund fehlender katalytischer Reste geschlossen, dass PA14 eher eine kohlenhydratbindende als eine katalytische Funktion aufweist^[58].

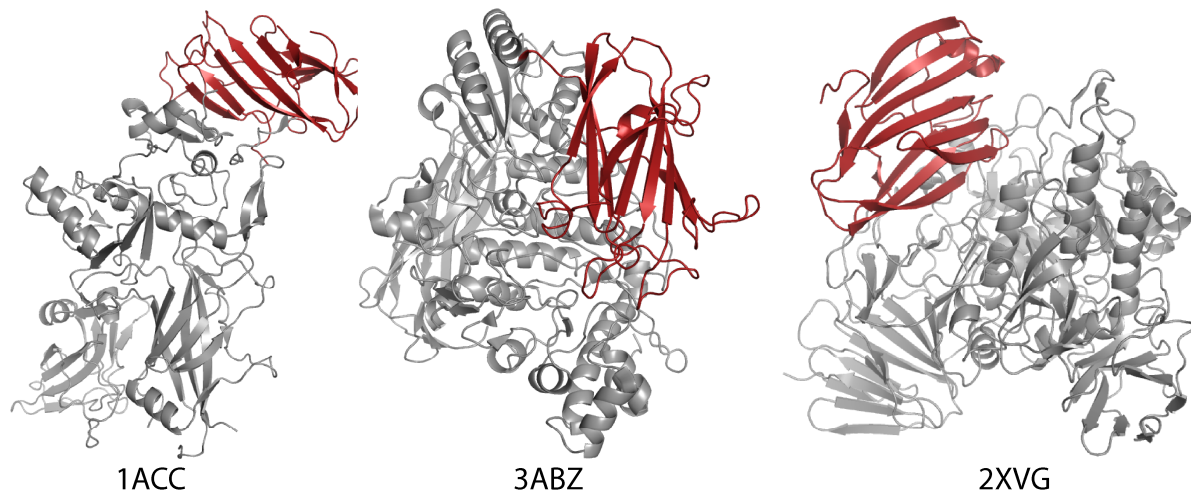


Abb.1.3: Bisher bekannte Proteinstrukturen, die eine PA14-Domäne (rot hervorgehoben) enthalten. PDBID 1ACC zeigt das protektive Antigen aus dem Anthrax-Toxin, 3ABZ zeigt eine β -Glucosidase aus *Kluyveromyces marxianus* und 2XVG zeigt eine α -Xylosidase aus *Cellvibrio japonicus*.

Abgesehen von den in dieser Arbeit gezeigten A-Domänenstrukturen sind bisher drei Proteinstrukturen bekannt, die eine PA14-Domäne aufweisen (Abbildung 1.3). Neben dem protektiven Antigen des Anthrax-Toxins (1ACC) sind dies eine β -Glucosidase aus der Hefe *Kluyveromyces marxianus* (3ABZ)^[59] und eine α -Xylosidase aus dem Bakterium *Cellvibrio japonicus* (2XVG)^[60]. Während PA14 selbst keine Aktivität zur Bindung von Kohlenhydraten aufweist, sind die beiden anderen Proteine Glycosidasen, in denen aber die PA14-Domäne nicht an der Katalyse beteiligt ist. Die strukturell aufgeklärten Kohlenhydrate befinden sich in beiden Glycosidasen nur peripher zu der PA14 Domäne.

PA14 Domänen wurden mittlerweile in 469 Spezies gefunden, darunter sowohl Archaea, Prokaryoten als auch in Eukaryoten^[61]. Diese Domäne findet sich in bakteriellen Toxinen wie dem Anthrax- und dem Botox-Toxin, in bakteriellen und pilzlichen β -Glucosidasen, in bakteriellen α -Xylosidasen, in eukaryotischen Glycosyltransferasen, in pilzlichen Adhäsinen^[58], und auch als Teil eines Quorum-Sensing-Proteins in *Dictyostelium discoideum*^[62]. Den in Archaeen enthaltenen PA14-Domänen-Proteinen wurden, abgesehen von einer Glycosylhydrolase, noch keine Funktionen zugeordnet. Auch im Menschen wurden 7 DNA-Sequenzen, die für PA14-Domänen enthaltende Proteine kodieren gefunden, darunter Fibrocystin-L und drei Acetylgalactosaminyltransferasen^[63-65].

1.4.2 Flokkuline des Flo5/PA14-Flokkulin-Typs

Flokkulation von Hefe wurde im Jahr 1976 als das Phänomen definiert, bei dem Hefezellen zusammenklumpen und rasch sedimentieren^[66]. In den folgenden Jahren entwickelte sich die heute gültige Definition: „Flokkulation ist die asexuelle, reversible und calciumabhängige Aggregation von Hefezellen, zu Flocken von tausenden von Zellen, die rasch am Boden der Nährlösung sedimentieren“^[52, 67, 68].

Flokkuline des Flo5/PA14-Typs sind allein für diesen Phänotyp ausreichend, da nicht flokkulierende Stämme, die mit Flokkulingenen transformiert wurden, entsprechendes Verhalten zeigten^[69-71]. Es wurde auch nachgewiesen, dass im speziellen die A-Domäne der Flokkuline für die Flokkulierung notwendig ist, da Hefen, die Flokkuline bestehend nur aus B- und C-Domäne produzieren, nicht flokkulieren^[30].

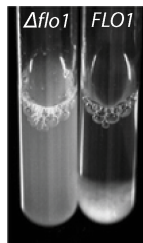


Abb.1.4: Phänotyp der *FLO1* und *FLO5* Expression in *S. cerevisiae*. Während Zellen, die kein Flokkulin exprimieren lange in Suspension bleiben, sinken Flokkulin-produzierende Zellen nach Durchmischung rasch ab. Die Fotografie wurden Bauer *et. al.*^[47] entnommen.

Die Flokkulation lässt sich beim Flo1-Typ, zu dem Flo1, Flo5, Flo9 und Flo10 gehören, durch Mannosezugabe inhibieren. Beim *NewFlo*-Typ, der in Lager-Hefen, die das Protein LgFlo1 auf dem Locus von Flo5 enthalten^[72], vorkommt, lässt sich die Flokkulation zusätzlich auch durch Glucose, Maltose und Saccharose inhibieren. Hierfür wurde von Kobayashi *et al.* 1998 ein Pentapeptid im Bereich der Aminosäuren 226-230 in der Flo1A-Domäne sowie die Aminosäure an Stelle 202 in der Flo1A-Domäne verantwortlich gemacht. Die Flokkulation der als *NewFlo*-Typ untersuchten Varianten ließ sich zwar zum Teil durch Glucosezugabe inhibieren, allerdings war auch die Flokkulation insgesamt schwächer^[44].

1.4.3 Epitheliale Adhäsine in *Candida glabrata*

Die epithelialen Adhäsine aus *C. glabrata* wurden 1999 als wichtiger Pathogenizitätsfaktor entdeckt^[21]. Zunächst wurde nur Epa1 als Adhäsine, das für die Infektion von Epithelzellen zuständig ist, ausfindig gemacht, doch nach der Sequenzierung des *C. glabrata* Genoms^[73] wurden in einigen Stämmen bis zu 23 verschiedene EPA-Gene gefunden^[22]. Dennoch ist

zumindest *in vitro* Epa1 das Adhäsın, das die stärkste Adhäsion an Epithelzellen zeigt, da diese nach einer Deletion von *EPA1* auf Hintergrundniveau absinkt. Die Regulation könnte aufgrund der subtelomeren Lokalisierung der *EPA*-Gene ähnlich wie bei den PA14-*FLO*-Genen auf transkriptionellen *silencing*-Mechanismen beruhen^[74, 75]. Die Epa-Adhäsine sind strukturell ähnlich zu den Flo-Adhäsinen aufgebaut, sowohl was ihre Superstruktur mit adhäsiver A-Domäne, hochglycosylierter B-Domäne und GPI-Anker in der C-Domäne angeht, als auch in der Verwandtschaft der A-Domäne mit der PA14-Domäne aus *Bacillus anthracis*^[27]. Die Spezifität der Epa-Adhäsine ist nicht vollständig geklärt. Zunächst wurde für Epa1 durch Zell-Adhäsionstests eine Spezifität für N-Acetyl-Lactosamin (Gal- β -1,4-GlcNAc) gefunden^[76], später wurde durch einen Hochdurchsatztest (*Glycan microarray analysis*) mehrerer verschiedener Epa-Adhäsine die Kohlenhydratspezifität genauer bestimmt. Dabei wurde festgestellt, dass Epa1 Galactose bindet, die β -1,3- oder β -1,4-glycosidisch verknüpft ist. Bei diesen Versuchen wurde auch ein bestimmter, hypervariabler Bereich des Proteins für die unterschiedliche Spezifität der einzelnen Epa-Adhäsine verantwortlich gemacht. Dieses hypervariable Pentapeptid wurde mit der Vorhersage von Kobayashi *et al.* bezüglich der unterschiedlichen Spezifität von Flo1 und LgFlo1 verglichen. Dabei wurde gefunden, dass die spezifitätsbestimmende Region in Epa-Adhäsinen mit der in Flokkulinen übereinzustimmen scheint^[77].

1.4.4 PA14-Adhäsine aus anderen Organismen

PA14 Adhäsine, die keinen Organismen aus der Familie *Saccharomycetaceae* entstammen, wurden in der Gattung *Trichoderma*, filamentösen Pilzen, die auf totem Holz wachsen, besonders während der Sporulation gefunden. Das Protein cmp1 ist ein Multidomänenprotein aus *Trichoderma harzianum* und zeigt seine PA14-Domäne im hinteren Drittel der Proteinsequenz^[58, 78]. Die Wirkungsweise ist noch nicht aufgeklärt. Kürzlich wurde ein PA14-Adhäsın aus dem Bakterium *Myxococcus xanthus* untersucht, das in die Bildung von Biofilmen dieses Bakteriums involviert ist^[79]. Das Protein TraAB zeigt ähnlich den Flo5-Typ Adhäsinen eine N-terminale PA14-Domäne, der eine repetitive, allerdings cysteinreiche Domäne folgt.

1.5 Flo11-Domänen-Adhäsine

Das Flokkulin Flo11 aus *S. cerevisiae* unterscheidet sich von den anderen Flokkulinen dadurch, dass die N-terminale Domäne nicht zur PA14 Domäne, sondern zu einer eigenen Flo11-Domäne gezählt wird (PF10182)^[61]. Außerdem zeigt die B-Domäne keine Flokkulin-

Repeats (PF00624), ist aber dennoch hoch repetitiv, serin- und threoninreich und daher sehr wahrscheinlich hoch mannosyliert^[80].

Flo11-Domänen wurden bisher mit einer Ausnahme in der Ordnung Schizosaccharomycetales (mögliches Zellagglutinin, UniProt: Q9URU4) nur in Pilzen der Ordnung Saccharomycetales gefunden. Der Großteil der gefundenen Proteine trägt die Flo11-Domäne am N-Terminus, gefolgt von einer längeren Region geringer Komplexität. In einigen Proteinen kommt die Flo11-Domäne aber auch im mittleren Bereich eines Proteins und zum Teil mehrfach vor. In *C. albicans* wurde das zu Flo11 homologe Zellwandprotein Rbt1 (UniProt Q59TK9) gefunden, das erst in der dritten Iteration eines PSI-Blasts auftaucht und mit einer Sequenzidentität von 14.7% sehr entfernt verwandt ist. Rbt1 ist in Biofilmbildung und filamentöses Wachstum von *C. albicans* involviert^[81]. In *C. glabrata* wurden keine Flo11-ähnlichen Proteine gefunden.

1.5.1 Phänotypen der Expression von *S. cerevisiae* Flo11

Das Flokkulin Flo11 (alternativer Name Muc1) wurde 1996 in *Saccharomyces diastaticus* entdeckt. Hier sorgt es ebenso wie die Flokkuline mit PA14 Domäne für calciumabhängige, mannoseinhibierbare Flokkulation^[48] und wurde daher den klassischen Flokkulinen zugeordnet. Kurze Zeit später wurde festgestellt, dass in *S. cerevisiae* Σ 1278b keine Flokkulation, sondern invasives Wachstum in Agar und die Ausbildung von Pseudohyphen^[54, 82] bei *FLO11* Expression beobachtet werden konnte. Weitere Phänotypen, die von der *FLO11* Expression ausgehen sind die Matten- oder Biofilmbildung auf niedrig konzentrierten (0.3%) Agarplatten, die Adhäsion an verschiedene Kunststoffe^[18] und eine Flor-Bildung, bei der eine dünne Schicht Hefezellen an die Oberfläche ihres Nährmediums steigt^[83, 84]. Die drei letztgenannten Phänotypen lassen sich durch eine erhöhte Hydrophobizität der Zellwand erklären, die für *FLO11* exprimierende Zellen beobachtet wurde^[18]. Die durch Flo11 vermittelten Phänotypen sind in Abbildung 1.5 dargestellt.

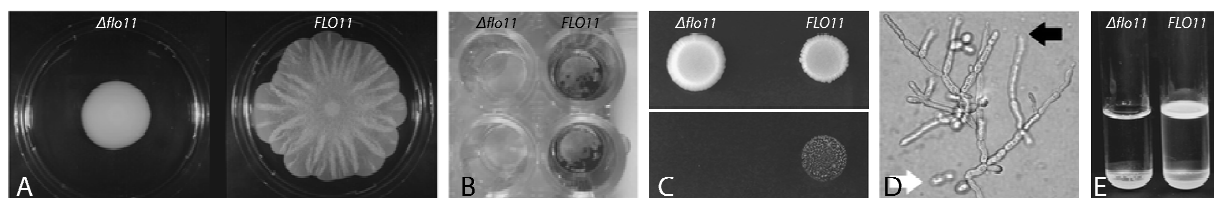


Abb.1.5: Phänotypen der *FLO11* Expression in *Saccharomyces cerevisiae*. **A** *FLO11*-Stämme zeigen Biofilm- oder Mattenbildung. **B** *FLO11*-Stämme zeigen Adhäsion an Polystyrol. **C** haploide *FLO11*-Stämme zeigen invasives Wachstum in Agar. **D** diploide *FLO11*-Stämme zeigen pseudohyphales Wachstum. **E** *FLO11*-Stämme zeigen Flor-Bildung. Die Fotografien wurden Bauer *et. al.*^[47] entnommen.

Ein Teil der Phänotypen lässt sich auch durch Überexpression anderer Flokkuline hervorrufen. So adhären Zellen die Flo1, Flo5, Flo9 oder Flo10 überexprimieren an Polystyrol und zeigen auch insgesamt eine sehr hydrophobe Oberfläche. Für die Adhäsion an Agar wird hingegen Flo11 oder Flo10 benötigt^[85]. Der Mechanismus, der hinter diesen verschiedenen Phänotypen steht, ist bisher nicht aufgeklärt, es scheint aber plausibel, dass verschiedene Eigenschaften von Flo11 für die Vielzahl an Phänotypen verantwortlich sind. Der Grund für die Stammabhängigkeit, die einzelne Phänotypen zeigen, könnte in unterschiedlichen Glycosylierungen von Flo11 oder anderen Glycoproteinen auf der Zelloberfläche liegen, doch auch dies ist nicht genau aufgeklärt^[80].

In *in vitro* Experimenten wurde festgestellt, dass Flo11A nicht mit Mannose interagiert, vielmehr scheint eine homotypische Interaktion zwischen Flo11A Domänen statt zu finden^[86]. Dies schließt zumindest einen ähnlichen Mechanismus für die Flokkulation wie in den PA14-Flokkulinen aus.

In Arbeiten, die vor kurzem publiziert wurden, wird ein Zusammenhang zwischen einer Biofilmbildung und einer proteolytischen Prozessierung von Flo11 auf der Zelloberfläche postuliert^[87]. Daraus resultiert zum einen eine weitere Regulationsmöglichkeit der Adhäsion zum anderen könnte das verdaute Flo11-Fragment zwischen den Zellen eines Hefe-Biofilms Aufgaben eines Bestandteils einer extrazellulären Matrix übernehmen, wie sie aus bakteriellen Biofilmen bekannt ist.

1.6 Das Zellwandprotein Sun4

Das Zellwandprotein Sun4 aus *S. cerevisiae* enthält eine innerhalb des Phylums der Ascomyceten konservierte C-terminale Domäne, die SUN-Domäne^[61] (PFAM: PF03856). Allein in *S. cerevisiae* werden vier Proteine gefunden, die eine SUN-Domäne enthalten, nämlich Sim1, Uth1, Nca3 und Sun4. Die Proteine Sim1, Uth1 und Nca3 sind in verschiedene zelluläre Prozesse, wie DNA-Replikation, Alterung und mitochondriale Biogenese eingebunden^[88]. Sun4 wurde als lösliches Zellwandprotein 3 (*soluble cell wall protein 3*, scw3), zum ersten Mal 1998 charakterisiert^[89]. Dabei wurde eine Sequenzhomologie zu der β -Glucosidase aus *Candida wickerhamii* (61% Identität, 72% Ähnlichkeit)^[90] festgestellt. Allerdings konnte für Sun4 Einzeldelationen zunächst kein Phänotyp bestimmt werden^[89, 91]. Dies gelang erst im Jahr 2000 durch Mouassite *et al.* mittels Elektronenmikroskopie. Dabei zeigte sich, dass in *Δsun4*-Zellen die Abtrennung der Tochterzellen von der Mutterzelle verzögert ist. Die Tochterzellen verbleiben lange an der Mutterzelle und werden sehr groß, während die Mutterzelle schon einen neuen Zellzyklus beginnt, bevor die Tochterzelle

vollständig abgetrennt ist. Durch genauere Betrachtung der Knospungsstelle kann ein Defekt in der Zellwandreorganisation beobachtet werden, das Gebiet des Septums ist ungewöhnlich dick und wird nicht abgebaut (Abbildung 1.6). Dies ist ein Phänotyp, der kompatibel mit einer möglichen β -Glucanaseaktivität für Sun4 ist^[88].

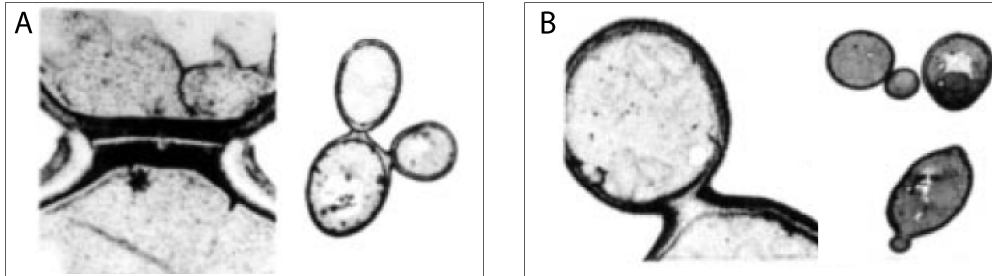


Abb.1.6: Phänotyp der *SUN4* Deletion in *Saccharomyces cerevisiae*. **A** Δ *sun4*-Stämme zeigen eine erschwerte Trennung der Zellwand zwischen der Mutter- und der Tochterzelle. Daraus resultieren Mutterzellen, die sich noch nicht von Ihrer Tochter getrennt haben, aber schon den nächsten Zellzyklus beginnen. **B** *SUN4* wird exprimiert, die Tochterzellen trennen sich rechtzeitig von der Mutterzelle. Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen stammen aus Mouassite *et al.*^[88].

Da eine Doppeldeletion Δ *sun4*/ Δ *uth1* den gleichen Phänotyp noch deutlich ausgeprägter aufweist, wird davon ausgegangen, dass Uth1 Funktionen von Sun4 übernehmen kann. Diese Annahme wird dadurch unterstützt, dass Uth1, entgegen ersten Beobachtungen, nicht nur in den Mitochondrien^[92] sondern auch in der Zellwand einer Hefezelle vorliegen kann^[93].

Homologe zu *SUN4* in *Candida albicans* sind *SUN41* und *SUN42* (*SIM1*). Werden *SUN41* und *SUN42* gleichzeitig deletiert, ist *C. albicans* aufgrund der Lyse von Mutterzellen nach der Septierung nicht lebensfähig. Elektronenmikroskopie zeigt auch hier Zellwanddefekte an der Knospungsstelle. Durch Supplementierung der Doppeldeletionsvariante Δ *sun41*/ Δ *sun42* mit *UTH1* aus *S. cerevisiae* ließen sich wieder lebensfähige Zellen erzeugen^[94]. Dies deutet auf hohe Konservierung der verschiedenen SUN-Domänen Proteine und auf eine hohe funktionelle Redundanz unter Ihnen hin.

Die Deletionsvariante Δ *sun41* zeigt Zellwanddefekte ähnlich einer *SUN4*-Deletion in *S. cerevisiae*^[95]. Außerdem ist Sun41 essentiell für die Biofilmbildung und Deletionsvarianten zeigen eine deutlich geringere Caspofungin-Toleranz^[96]. Wenn also die Funktion von Sun41 ausgeschaltet werden kann, wird die Virulenz von *C. albicans* deutlich gesenkt. Dies macht Sun41, zusammen mit dem ubiquitären Vorkommen von SUN-Domänen in anderen Ascomyceten aber nicht in anderen Lebewesen, zu einem interessanten pharmakologisch relevanten Zielmolekül.

1.7 Zielsetzung.

Das Ziel dieser Arbeit war es, das Verständnis des Mechanismus der Zell-Zell sowie der Zell-Oberflächen Interaktion von *S. cerevisiae* und verwandten Hefen zu vertiefen und Adhäsionsprozesse auf molekularer Ebene aufzuklären. Diese Prozesse, die große Relevanz in industriellen Prozessen, aber auch in der medizinischen Forschung haben, waren zuvor in großen Teilen nur phänotypisch untersucht worden. Um Einblicke in die verschiedenen Typen der Hefeadhäsion zu erhalten, sollten sowohl Adhäsionsdomänen aus der Gruppe der PA14-Familie als auch aus der Flo11-Familie per Röntgenstrukturanalyse charakterisiert und die interagierenden Strukturen auf anderen Zellen oder Oberflächen aufgeklärt werden.

Die Wahl fiel auf die A Domänen von Flo5, als dominantes Flokkulin in *S. cerevisiae* Laborstämmen, LgFlo1 als Flokkulin industrieller Brauhefen, Epa1 als entscheidender Pathogenizitätsfaktor aus *Candida glabrata* und Flo11 aus *S. cerevisiae* als Modell für die nicht-lektinartige, asexuelle Adhäsion verschiedener Hefen.

Die strukturelle Untersuchung der hoch konservierten C-terminalen SUN-Domäne des löslichen Zellwandproteins Sun4 aus *S. cerevisiae*, die in einer Vielzahl pilzlicher Proteine verschiedener Lokalisation vorkommt, sollte zum Verständnis der pilzlichen Zellwand und damit der wichtigsten Interaktionsfläche von *S. cerevisiae* und der mit dieser verwandten Pathogenen beitragen.

2 Material

2.1 Geräte

Gerät	Bezeichnung (<i>Hersteller</i>)
Äkta Purifier-System	Box-900, Fraktionskollektor Frac-950, Monitor pH/C-900, Monitor UV-900, Pumpe P-900 (<i>GE Healthcare</i>)
Äkta Prime-System	(<i>GE Healthcare</i>)
Autoklav	T-Line (<i>Fedegari</i>) HV110-L (<i>HMC</i>)
automatisierte Proben- Aufbereitung	QIAcube (<i>Qiagen</i>)
bidest. Wasser-Anlage	Seralpur Pro90CN (<i>Seral</i>)
Brutschrank	(<i>Binder</i>)
CD-Spektropolarimeter	Spektropolarimeter J-810 (<i>Jasco</i>)
Digitalkamera	D70s (<i>Nikon</i>)
Dokumentationssystem für Agarosegele	Computer E.A.S.Y., Kamera (beide <i>UVP</i>), UV-Schirm (<i>Herolab</i>)
Dokumentationssystem für Kristallisationsansätze	RockImager 1000 (<i>Formulatrix</i>)
Elektrophoresekammer für Agarose-Gele	(Feinmechanische Werkstatt, FB Chemie, Universität Marburg)
Elektrophoresekammer für SDS-PAGE	Mighty Small II SE250 / SE260 (<i>Hoefer</i>)
Fluoreszenzspektrometer	FP-6500 (<i>Jasco</i>)
FPLC-System	Gradient Programmer GP-250 Plus, Pump P-500, Single Path Monitor UV-1, Fraktionskollektor Frac-100, Schreiber Rec112 (<i>GE Healthcare</i>)
French-Press	(Thermo, Feinmechanische Werkstatt FB Biologie)
Kristallisationsroboter	Cartesian MicroSys 4000-XL (<i>Genomic Solutions</i>) Cartesian HoneyBee 963 (<i>Genomic Solutions</i>)
Mikroskop	B601 (<i>Olympus</i>), MZ 8 (<i>Leica</i>)
pH-Meter	(<i>Sartorius</i>)
Photometer	ND-1000 (<i>Nanodrop</i>), Ultrospec 3100pro (<i>GE Healthcare</i>)

Pipetten	Research (<i>Eppendorf</i>)
Quarzküvette	105.200-QS 10 mm (<i>Hellma</i>), 110-QS 1 mm (<i>Hellma</i>), 150.250-QS 10 mm (<i>Hellma</i>)
Röntgendiffraktometer	FR591 Drehanode (<i>Bruker-AXS</i>) mar345 desktop beamline (<i>marresearch</i>)
Schüttelinkubatoren	Certomat IS (<i>Sartorius</i>), Controlled Environment Incubator Shaker (<i>New Brunswick Scientific</i>), Multitron (<i>InforsHT</i>)
Spannungsquelle	EPS 300 / EPS 301 (<i>GE Healthcare</i>)
Thermocycler	Robocycler Gradient 96 Temperature Cycler (<i>Stratagene</i>)
Ultraschallgerät	Sonifier 250 (<i>Branson</i>)
Waagen	PC2200 (<i>Mettler</i>) LabStyle 54 (<i>MettlerToledo</i>)
Wasserbad	NK22 (<i>Haake</i>)
Zentrifugen	Centrifuge 5810 R (<i>Eppendorf</i>), J2-HS Zentrifuge mit JA10- / JA20-Rotor (<i>Beckman</i>), Biofuge 15 (<i>Heraeus</i>)

2.2 Verbrauchsmaterialien

Einmalküvetten	67.724 (<i>Sarstedt</i>)
Entsalzungssäulen	PD-10 Desalting Columns (<i>GE Healthcare</i>) PD MiniTrap G25 (<i>GE Healthcare</i>) Illustra MicroSpin G-50 Columns (<i>GE Healthcare</i>)
Kit für Gelextraktion	QIAquick Gel Extraction Kit (<i>Qiagen</i>)
Kit für DNA-Reinigung	QIAquick PCR Purification Kit (<i>Qiagen</i>)
Kit für Plasmidpräparation	QIAprep Spin Miniprep Kit (<i>Qiagen</i>)
Kristallisationszubehör	96-well Innovaplate (<i>Innovadyne</i>), VIEWseal (<i>Greiner BIOone</i>), SilverSeal (<i>Greiner BIOone</i>), 24-well Crystallization Tool Platten mit CrystalSupport (<i>NeXtal / Qiagen</i>)
Konzentratoren	Amicon Ultra-15 / Amicon Ultra-5 Centrifugal Filter Devices, 10000 MWCO (<i>Millipore</i>)
Spritzenvorsatzfilter	Filtropur S 0.2. 0.2 µm Porengröße (<i>Sarstedt</i>) Filtropur S 0.45, 0.45 µm Porengröße (<i>Sarstedt</i>)
Sterilfilter	Ultrafree-MC (<i>Millipore</i>), Flaschenaufsatzfilter (<i>Millipore</i>)

2.3 Chemikalien

Acrylamid (30%)	<i>Roth</i>
Agar	<i>Roth</i>
Agarose	<i>Invitrogen</i>
APS	<i>Fluka</i>
L-Arginin	<i>Fluka</i>
Bacto-Trypton	<i>Difco</i>
Bacto-Hefeextrakt	<i>Difco</i>
Biotin	<i>ICN Biochemicals</i>
Bradford-Reagenz	<i>BioRad</i>
Coomassie-Brilliant-Blue	<i>Serva</i>
DNA-Leiter	<i>MassRuler DNA Ladder Mix (Fermentas)</i>
Na ₂ EDTA	<i>Roth</i>
Ethidiumbromid	<i>Roth</i>
D-(+)-Glucose	<i>Sigma</i>
Glycerin	<i>Fluka</i>
GSH	<i>Sigma</i>
GSSG	<i>Aldrich</i>
Hellmanex	<i>Hellma</i>
L-Isoleucin	<i>Serva Feinbiochemika</i>
Imidazol	<i>Merck</i>
IPTG	<i>Duchefa</i>
Kanamycin	<i>AppliChem</i>
Kristallisationsscreens	<i>Qiagen</i>
L-Leucin	<i>Serva Feinbiochemika</i>
L-Lysin	<i>Acros Organics</i>
D-(+)-Mannose	<i>Fluka</i>
L-Methionin	<i>Merck</i>
2-Mercaptoethanol	<i>Roth</i>
Ni-NTA Superflow	<i>Qiagen</i>
PAGE-Marker	<i>peQGOLD Protein-Marker (peQLab)</i>
L-Phenylalanin	<i>Serva Feinbiochemika</i>
PMSF	<i>Fluka</i>
SDS	<i>Merck</i>

L-Selenomethionin	<i>Acros Organics</i>
Superdex 200 Prep grade	<i>Qiagen</i>
Spectinomycin	<i>Applichem</i>
Streptomycin	<i>Sigma</i>
TEMED	<i>Roth</i>
Tetracyclin	<i>AppliChem</i>
Thiamin	<i>Acros Organics</i>
L-Threonin	<i>Acros Organics</i>
Tris	<i>Roth</i>
Tween-20	<i>Roth</i>
L-Valin	<i>Merck</i>
Virkon	<i>Antec International</i>

Alle nicht gesondert aufgeführten Chemikalien wurden in p.a.-Qualität von den Firmen *Aldrich*, *Fluka*, *Merck* oder *Sigma* bezogen.

2.4 verwendete Saccharide und Oligosaccharide

Mannose	Man	<i>Fluka</i>
Glucose	Glc	<i>Fluka</i>
N-Acetylgalactosamin	GalNAc	<i>SigmaAldrich</i>
α -1,2-Mannobiose	Man- α -1,2-Man	<i>DextraLabs</i>
α -1,3-Mannobiose	Man- α -1,3-Man	<i>DextraLabs</i>
α -1,6-Mannobiose	Man- α -1,6-Man	<i>DextraLabs</i>
Man3 (D1)	Man- α -1,2-Man- α -1,2-Man	<i>C. Unverzagt, Bayreuth</i>
Man5 (D2-D3)	Man- α -1,2-Man- α -1,3-(Man- α -1,2-Man- α -1,6-)Man	<i>C. Unverzagt, Bayreuth</i>
Man5-core	Man- α -1,3-(Man- α -1,3-(Man- α -1,6-)Man- α -1,6-)Man	<i>Dextra Labs</i>

2.5 Enzyme

AseI (10 U/ μ L)	<i>New England Biolabs</i>
BSA (10 mg/mL)	<i>New England Biolabs</i>
DNAseI	<i>Boehringer, Mannheim</i>
Lysozym (50 mg/mL)	<i>Boehringer, Mannheim</i>

NdeI (20 U/μL)	<i>New England Biolabs</i>
NotI (10 U/μL)	<i>New England Biolabs</i>
Phusion HiFi-DNA-Polymerase (2 U/μL)	<i>Finnzymes / New England Biolabs</i>
T4-DNA-Ligase (400 U/μL)	<i>New England Biolabs</i>
Taq-Polymerase	<i>New England Biolabs</i>
XhoI (20 U/μL)	<i>New England Biolabs</i>

2.6 Klonierungsprimer

Im Rahmen dieser Dissertation wurden verschiedene Hefe-Zellwand-Proteine in unterschiedlichen Längen hergestellt. Die Grenzen der Domänen wurden mit Hilfe von bioinformatischen Werkzeugen wie Sekundärstrukturvorhersage mit Psipred^[97, 98] und Ordnungsvorhersage mit GlobPlot^[99] festgelegt. Bei homologen Strukturen wurden auch Sequenzvergleiche verwendet. In Tabelle 2.1 sind die benutzten Primer zusammengefasst. Die verwendeten Restriktionsschnittstellen sind fett gedruckt. Die Primer für SUN4 wurden von Dr. Manuel Maestre Reyna erstellt, sind hier aber der Vollständigkeit halber angegeben.

Tab.2.1: Oligonucleotide zur Genamplifizierung in 5'-3' Richtung

Flo5A-fwd	CCATATG TCAGGAGCCACAGAGGCG
Flo5A-rev	ACTCGAG TTAATGTATTGAAGGATCAGGGATAGTAC
Flo11A-fwd	CCATATG TTTCCAAGTGCAGTTCCTAGAG
Flo11A-rev	ACTCGAG TTAAGATGACTTCGTACCGCCAC
ΣFlo11A-fwd	CCATATG TTTCCAAGTGCAGTTCCTAGAG
ΣFlo11A-rev	ACTCGAG TTATGGAGTTGGTACTGGAGCAC
LgFlo1A-fwd	CATCAT CCATATG GGAAGTACACAAGCATG
Lg-Flo1A-rev	AGCGGCCG CTTAATGTTTTGAAGGATCAGG
Epa1A-fwd	CCATATG ACATCTTCCAATGATATCAG
Epa1A-rev	ACTCGAG TTAAGAAGAATCGTAGCTG
SUN4-C-fwd	GGGGGG ATTAATG GGAAGTATCTACGGTGATTTGGC
SUN4-C-rev	GTGGT CCTCGAG TTAGTTGTATAGAACAACCTTAGCTTTGCC

2.7 verwendete Vektoren

2.7.1 pCR 2.1-TOPO-Vektor

Der pCR 2.1-TOPO-Vektor (*Invitrogen*) wurde zur Klonierung verschiedener PCR-Produkte genutzt. Er wird linearisiert, mit einzelnen 3'-T-Überhängen eingesetzt. Die Topoisomerase I aus dem Vaccinia-Virus, welche kovalent an den Vektor gebunden ist, kann mit PCR-Produkten, die einen 5'-A-Überhang besitzen, wie ihn beispielsweise die DNA-Polymerase aus *Thermus aquaticus* erzeugt, eine Autoligation mit dem Vektor durchführen.

Dieser Vektor wurde bei der Konstruktion der Expressionsvektoren für die Konstrukte mit Flo5A-, Flo11A-, Σ Flo11A- und Epa1A-Genfragmenten eingesetzt.

2.7.2 pET-28a(+)-Vektor

Der pET-28a(+)-Vektor (*Novagen*) wurde zur Produktion der in dieser Dissertation hergestellten rekombinanten Proteine eingesetzt. Die Transkription findet durch T7-RNA-Polymerase statt^[100]. Die Expression dieser im entsprechenden Expressionsstamm kodierten Polymerase steht unter Kontrolle des lacUV5-Promotors, an welchen ein lac-Repressor, kodiert durch das Gen lacI, bindet. Durch Zugabe von Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG) lässt sich diese Repression lösen. Die Expression des Zielgens unter Kontrolle des T7lac-Promotors und wird ebenfalls durch lacI reprimiert und durch IPTG induziert^[101]. Der Vektor ermöglicht ebenso die Fusion eines N- wie die eines C-terminalen Hexa-Histidin-tags am Zielprotein und vermittelt eine Kanamycin-Resistenz. In dieser Arbeit wurden mittels der Restriktionsenzyme *NdeI* und *XhoI* Fusionen der Zielproteine mit N-terminalem Hexa-Histidin-tag hergestellt.

2.8 verwendete Bakterienstämme

2.8.1 *E. coli* TOP10F'

Genotyp: F' {lacI^q Tn10 (Tet^R)} *mcrA* Δ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*) Φ 80lacZ Δ M15
 Δ lacX74 *recA1* *araD139* Δ (*ara-leu*)7697 *galU* *galK* *rpsL* *endA1* *nupG*

Chemisch kompetente *E. coli* TOP10F'-Zellen (*Invitrogen*) wurden aufgrund ihrer sehr hohen Transformationseffizienz zu TOPO-Klonierungen eingesetzt.

2.8.2 *E. coli* DH5 α

Genotyp: F- Φ 80lacZ Δ M15 Δ (lacZYA-argF) U169 *recA1* *endA1* *hsdR17* (r_k⁻, m_k⁺)
phoA *supE44* λ - *thi-1* *gyrA96* *relA1*

Sowohl elektrokompente als auch chemisch kompetente *E. coli* DH5 α -Zellen (*Invitrogen*) wurden zur Plasmidgewinnung eingesetzt, da sie sich durch eine hohe Plasmidreplikationsrate auszeichnen.

2.8.3 *E. coli* Origami2 (DE3)

Genotyp: Δ (*ara-leu*)7697 Δ lacX74 Δ phoA PvuII *phoR* *araD139* *ahpC* *galE* *galK* *rpsL*
 F'[lac⁺ lacI^q *pro*] (DE3) *gor522::Tn10* *trxB* (Str^R, Tet^R)

E. coli Origami2-Zellen (*Novagen*) wurden in dieser Arbeit zur Produktion verschiedener Zielproteine verwendet. Der Stamm ist ein K-12 Derivat mit Mutationen in der Thioredoxin-Reduktase und der Glutathion-Reduktase. Durch diese Mutationen wird das reduzierende Milieu des Cytosols soweit oxidativ, dass stabile Disulfidbrücken gebildet werden können^[102]. Proteine, die in nativer Form Disulfidbrücken enthalten, können auf diese Weise nativ produziert werden. Der Origami2-Stamm trägt Resistenzen gegen Streptomycin und Tetracyclin und ist Leucin-auxotroph.

2.8.4 *E. coli* SHuffle T7 Express

Genotyp: fhuA2 lacZ::T7 gene1 [lon] ompT ahpC gal λ att::pNEB3-r1-cDsbC (Spec^R, lacI^q) Δ trxB sulA11 R(mcr-73::miniTn10 --Tet^S)2 [dcm] R(zgb-210::Tn10 --Tet^S) endA1 Δ gor Δ (mcrC-mrr)114::IS10

E. coli SHuffle T7 Express Zellen (*NEB*) weisen ebenso wie Origami2-Zellen Mutationen in der Thioredoxin-Reduktase und der Glutathion-Reduktase auf und stellen somit ein oxidatives Milieu im Cytosol sicher. Des Weiteren enthält dieser Stamm die Disulfidisomerase DsbC, welche Disulfidbrücken spalten und neu knüpfen kann. Außerdem ist *E. coli* SHuffle T7 Express ein Derivat des *E. coli* B-Stammes und weist somit keine Leucin-Auxotrophie auf, was die Handhabbarkeit im Zusammenspiel mit Minimalmedien erheblich erleichtert.

2.9 verwendete Konstrukte

Tab.2.2: Aufstellung der verwendeten Expressionskonstrukte

Name	Konstrukt	Quelle
pET28a-Flo5A	Flo5A ²³⁻²⁷¹ in pET28a(+)	diese Arbeit
pET28a-Flo5A ^{Q98A}	Flo5A ^{23-271, Q98A} in pET28a(+)	[30]
pET28a-Flo5A ^{D160A, D161A}	Flo5A ^{23-271, D160A, D161A} in pET28a(+)	[30]
pET28a-Flo5A ^{K194A}	Flo5A ^{23-271, K194A} in pET28a(+)	[30]
pET28a-Flo5A ^{D202T}	Flo5A ^{23-271, D202T} in pET28a(+)	[30]
pET28a-Flo5A ^{Y222F}	Flo5A ^{23-271, Y222F} in pET28a(+)	[30]
pET28a-Flo5A ^{N224A}	Flo5A ^{23-271, N224A} in pET28a(+)	[30]
pET28a-Flo5A ^{S227A}	Flo5A ^{23-271, S227A} in pET28a(+)	[30]
pET28a-Flo5A ^{W228A}	Flo5A ^{23-271, W228A} in pET28a(+)	[30]
pET28a-Flo11A	Flo11A ²²⁻²¹¹ in pET28a(+)	diese Arbeit
pET28a- Σ Flo11A	Σ Flo11A ²²⁻²²⁶ in pET28a(+)	diese Arbeit
pET28a-Epa1A	Epa1A ³¹⁻²⁷¹ in pET28a(+)	[103]
pET28a-Sun4-C	Sun4-C ¹⁴⁷⁻⁴²⁰ in pET28a(+)	[104]

3 Methoden

3.1 Molekularbiologische Methoden

Ein Teil der molekularbiologischen Arbeiten wurde bereits in vorhergehenden Arbeiten durchgeführt^[103, 105], daher wird hier nur ein kurzer Überblick gegeben.

3.1.1 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion (polymerase-chain-reaction, PCR) wurde 1985 von Mullis *et al.* entwickelt. Sie ermöglicht die *in vitro* Vervielfältigung beliebiger DNA-Fragmente, in der Regel bis zu einer Länge von 10 kb^[106]. Dazu wird in einem zyklischen Prozess eine Templat-DNA mit Hilfe von künstlich hergestellten Oligonukleotid-Primern, welche den zu amplifizierenden Bereich der DNA flankieren, und Desoxynucleosidtriphosphaten durch eine hitzestabile Polymerase vervielfältigt.

Für die schnelle Bereitstellung der benötigten Temperaturen kamen spezialisierte Thermo- und Robocycler zum Einsatz, die synthetischen Oligonucleotidprimer stammten von *Metabion*. Als DNA-Polymerase wurde die Phusion-Polymerase von *Finnzymes* verwendet. Diese Polymerase zeichnet sich neben ihrer hohen Prozessivität vor allen Dingen durch ihre 3'→5' Exonucleaseaktivität aus, welche falsch eingebaute Nucleotide erkennen und korrigieren kann. Die Phusion-Polymerase erzeugt glatte DNA-Enden (*blunt ends*). Als Templat wurde genomische DNA des *S. cerevisiae*-Stammes S288c, des *S. cerevisiae*-Stammes Σ 1278b, des Brauerhefestamms *S. pastorianus*, sowie des *C. glabrata* Stammes CBS138 verwendet.

In den folgenden Tabellen 2.3 und 2.4 sind die Zusammensetzung der einzelnen Reaktionen und die verwendeten Reaktionsbedingungen aufgeführt.

Tab.2.3: PCR-Reaktionszusammensetzung

Substanz	V / μ L	Endkonzentration
5x Phusion-HF-Puffer	10	1x
dNTP-Mix (2 mM)	5	0.2 mM
5'-Primer (10 pM / μ L)	2	0.4 pM / μ L
3'-Primer (10 pM / μ L)	2	0.4 pM / μ L
Templat	1	
Phusion-Polymerase (2 U / μ L)	0.5	0.02 U / μ L
bidest. H ₂ O	ad 50	

Tab.2.4: PCR-Reaktionsbedingungen

Schritt	T / °C	t / min	Anzahl Zyklen
initiale Denaturierung	98	5	1
Annealing	53 - 60	5	
Elongation	72	1:50	
initiale Denaturierung	98	0:45	35
Annealing	53 - 60	0:45	
Elongation	72	1:05	
finale Elongation	72	7	1

Die *Annealing*-Temperaturen ergeben sich aus verschiedenen Schmelzpunkten der Primer, welche mit der Online-Applikation von *Integrated DNA Technologies* ermittelt wurden^[107].

Tab.2.5: Annealing-Temperaturen

Genfragment	Annealingtemperatur
Flo5A	53 °C
Flo11A	60 °C
ΣFlo11A	57 °C
LgFlo1A	57 °C
Epa1A	56 °C

3.1.2 Agarosegelelektrophorese

Der Erfolg der PCR wurde mittels Agarosegelelektrophorese überprüft. Dazu wurde ein Teil der PCR Reaktionen im Verhältnis 1:5 mit 6x DNA-Probenpuffer versetzt und in die Taschen eines Gels aus 1%-iger (w/v) Agaroselösung in TBE-Puffer gegeben. Die Elektrophorese wurde bei einer Spannung von 110 V durchgeführt. Nach Färben in einem Ethidiumbromidbad, konnte der Erfolg der PCR an distinkten Banden erkannt werden.

10x TBE-Puffer

Tris	1 M
Borsäure	1 M
EDTA	20 mM

6x DNA-Probenpuffer

Xylenxanol FF	0.25% w/v
Ficoll Typ 400	15% w/v

3.1.3 Klonierung

Zur Klonierung von Genfragmenten in den Expressionsvektor pET28a wurde der Umweg über den pCR2.1 TOPO-Vektor gewählt. Dies erleichterte die Verwendung des Restriktionsenzym *NdeI* in Kombination mit Primern, die nur kurze flankierende Sequenzen enthielten, die nicht komplementär zur Templat-DNA waren. Allerdings war nach Abschluss der PCR eine 3'-Adenylierung der *blunt-ends* des PCR-Produkts mittels Taq-Polymerase notwendig^[108]. Hierzu wurden 25 µL PCR-Produkt mit 3 µL ThermoPol-Puffer, 1 µL dATP (100 mM) sowie 5 U Taq-Polymerase versetzt und 10 Minuten bei 68 °C inkubiert. Anschließend wurden 3 µL der Adenylierungsreaktion mit 1 µL TOPO-Salzlösung (NaCl, 200 mM, MgCl₂, 10 mM), 1.5 µL bidest. H₂O und 0.5 µL pCR 2.1-TOPO-Vektor vermischt und 10 Minuten bei RT inkubiert. Mit diesem Gemisch wurden *E. coli* TOP10F'-Zellen chemisch transformiert, indem sie einem Hitzeschock ausgesetzt wurden (42 °C, 30 s). Positive Transformanten konnten auf Selektionsplatten, die Xgal und IPTG enthielten, mittels blau-/weiß-Screening identifiziert werden.

Aus diesen Transformanten gewonnene Plasmid-DNA wurde mittels der Sanger-Kettenabbruchmethode durch die Firma *Qiagen* sequenziert^[109]. Konnte die richtige Gensequenz des Konstrukts bestätigt werden, wurde die Plasmid-DNA mit den Restriktionsendonukleasen *NdeI* und *XhoI*, beziehungsweise *NotI* im Falle von LgFlo1, verdaut. Ebenso wurde mit dem Expressionsvektor pET28a verfahren, um linearisierte DNA mit den für die Ligation notwendigen *sticky ends* zu erhalten. Bevor die DNA-Fragmente ligiert wurden, fand eine Aufreinigung per Agarosegelelektrophorese mittels des QIAquick-Gel-Extraction-Kit (*Qiagen*) statt^[110]. Die anschließende Ligation erfolgte mit Hilfe der T4-DNA Ligase (*New England Biolabs*).

Tab.2.6: präparativer Verdau

Substanz	Volumen
Plasmid	15 µL
Reaktionspuffer 2 (10x)	5 µL
BSA (100x)	0.5 µL
bidest. H ₂ O	27.5 µL
<i>XhoI/NotI</i>	1 µL
<i>NdeI</i>	1 µL

Nach chemischer Transformation der so erhaltenen Plasmide in die Expressionsstämme *E. coli* Origami2 oder SHuffle T7 Express, konnten die jeweiligen pilzlichen Proteindomänen rekombinant hergestellt werden.

3.2 Proteinchemische Methoden

3.2.1 Überexpression von rekombinanten pilzlichen Proteindomänen

Die Produktion der Proteindomänen erfolgte nach einer Niedertemperaturmethode in *E. coli* Origami2 oder *E. coli* SHuffle T7 Express. Dazu wurden jeweils 2 Liter steriles LB (Lysogeny Broth)-Medium^[111] mit den entsprechenden Antibiotika in einem 5 Liter fassenden Schikane-Kolben im Verhältnis 1:50 oder 1:100 mit über Nacht angezogenen Vorkulturen inokuliert.

LB-Medium	
Bacto-Trypton	10 g/L
Bacto-Hefe-Extrakt	5 g/L
NaCl	10 g/L
NaOH-Lösung (10 M)	0.4 mL/L
dest. H ₂ O	ad 1 L

Nachdem die Kulturen bei einer Temperatur von 37 °C eine optische Dichte (OD₆₀₀) von 0.2 erreicht hatten, wurde die Temperatur auf 12 °C erniedrigt. Nachdem die Kulturen abgekühlt waren, war stets eine OD₆₀₀ von 0.6 bis 0.8 und somit eine optimale Zelldichte zum Start der rekombinanten Genexpression erreicht. Diese wurde mittels der Zugabe von IPTG auf eine Endkonzentration von 0.04 mM gestartet. Nach einer Inkubationszeit von 72 bis 96 h wurden die Zellen mittels Zentrifugation (10 min, 6353 g, 4 °C) vom Medium abgetrennt und in AM-Puffer resuspendiert.

AM-Puffer (pH 8.0)	
Tris	20 mM
NaCl	200 mM

3.2.2 Löslichkeitsstudien an Flo5A Varianten und zuvor nicht charakterisierten Flokkulinen

Die verschiedenen Varianten von Flo5A wurden, ebenso wie Σ Flo11 und LgFlo1A, bevor sie in größerem Maßstab hergestellt wurden, darauf getestet, ob sie sich nach denselben Verfahren löslich überproduzieren ließen, nach denen auch Flo5A und Flo11A erhalten werden konnten. Dazu wurden eine 50 mL LB-Medium mit Selektionsmarkern im Verhältnis 1:50 mit einer Übernachtskultur inokuliert, nach Anwachsen auf 12 °C abgekühlt und bei Erreichen einer Zelldichte von 0.6 mit einer Endkonzentration von 0.04 mM IPTG induziert. Nach einer Inkubationszeit von 72 h wurden die Zellen durch Zentrifugation geerntet (20 min,

3220 g, 4°C). Die in AM-Puffer resuspendierten Zellen wurden in einem Eppendorf-Gefäß per Ultraschallsonde aufgeschlossen (3x30 Ultraschallpulse, 20 kHz, 80 W, je 400 ms). Nach einer weiteren Zentrifugation wurden sowohl der lösliche als auch der unlösliche Anteil auf einem SDS-Gel analysiert.

3.2.3 Expressionen von Selenomethionin-markiertem Proteinen

Eine Möglichkeit, das Phasenproblem der Proteinkristallographie (siehe 3.4.9) zu lösen, ist die Verwendung der Anomalen Dispersion bei multiplen Wellenlängen (MAD)^[112]. Hierzu ist es notwendig, an definierten Stellen im Protein Schweratome zu platzieren. Als hervorragende Methode hierzu wurde die Produktion von Selenomethionin-markierten Proteinen entwickelt, bei der der Schwefel der Methionin-Seitenketten gegen Selen ausgetauscht ist^[113].

In dieser Arbeit wurde Flo11A in SHuffle T7 Express-Zellen unter metabolischer Repression der zelleigenen Methioninsynthese mit Selenomethionin markiert^[114]. Eine Markierung in Origami2 Zellen schlug aufgrund der Leucin-Auxotrophie dieses K12-Derivats fehl. Ein modifiziertes M9-Minimalmedium^[115] wurde für die Expressionen von Selenomethionin-markiertem Flo11A verwendet.

M9-Grundmedium (2 L)		M9-Salzlösung (5x)	
M9-Salze (5x)	400 mL	Na ₂ HPO ₄ · 12 H ₂ O	42.75 g
Glucoselösung (20%)	80 mL	KH ₂ PO ₄	7.5 g
MgSO ₄ -Lösung (1 M)	2 mL	NaCl	1.25 g
Thiaminlösung (0.5 % w/v)	200 µL	NH ₄ Cl	2.5 g
Biotinlösung (2 mg/mL)	20 mL	dest. H ₂ O	ad 500 mL
CaCl ₂ -Lösung (0.1 M)	2 mL		
dd. H ₂ O	ad 2 L		

Aminosäuregemisch	
L-Lysin	200 mg
L-Phenylalanin	200 mg
L-Threonin	200 mg
L-Isoleucin	100 mg
L-Leucin	100 mg
L-Valin	100 mg

2 L M9-Minimalmedium wurden mit 35 µg/mL Kanamycin versetzt und mit einer über Nacht angezogenen Kultur von SHuffle T7 Express Zellen, die pET_Flo11A trugen, im Verhältnis 1:100 inokuliert. Nach Erreichen einer Zelldichte (OD₆₀₀) von 0.2 wurde die Kultur auf 12 °C abgekühlt und nach weiteren 2 h wurde das Aminosäuregemisch in fester Form zugegeben, um eine metabolische Repression der Methioninbiosynthese zu erreichen. 15 min später

wurden 100 mg Selenomethionin in fester Form und IPTG in einer Endkonzentration von 0.05 mM hinzugefügt, um die Produktion der Selenomethionin-markierten Flo11A-Domäne zu starten. Die Ernte nach 78 h verlief ebenso wie bei der Produktion der Adhäsionsdomänen in LB-Medium.

3.2.4 Zellaufschluss im präparativen Maßstab

Der Aufschluss erfolgte im präparativen Maßstab mit einer French-Press, deren Funktionsprinzip eine schlagartige Entspannung der Zellsuspension von 60 bar auf Atmosphärendruck ist. Die dabei auftretenden Scherkräfte zerreißen die Zellmembranen. Zur Unterstützung des Aufschlusses und zur Inhibierung von Proteasen wurden der Zellsuspension EDTA (20 μ M), PMSF (20 μ M) und Lysozym (1 μ g/mL) hinzugefügt. Nachdem die Zellen ohne Wiederholung der Behandlung aufgeschlossen waren, wurde das Lysat durch Zentrifugation (40 min, 39086 g, 4 °C) und Filtration (0.45 μ m Porengröße) geklärt.

3.2.5 Chromatographische Aufreinigung

Nickel-NTA-Chromatographie

Die Nickel-NTA-Chromatographie ist eine Form der Affinitätschromatographie, genauer der immobilisierten Metallionenchromatographie (IMAC)^[116]. Deren Prinzip beruht auf der Komplexierung eines am Säulenmaterial immobilisierten Metallions durch einen Teil des Proteins, häufig durch ein rekombinant eingefügtes Histidin-*tag*.

In dieser Arbeit wurden N-terminale Fusionen der Adhäsionsdomänen mit einem Hexa-Histidin-*tag* über Ni-NTA-Superflow-Material (*Qiagen*) vorgereinigt. Dazu wurde das geklärte Zelllysate einer präparativen Expression mittels eines *Superloops* über Nacht mit einer Geschwindigkeit von 0.02 – 0.1 mL/min auf eine Säule mit circa 5 mL Bettvolumen aufgetragen. Anschließend wurde mit AM-Puffer gespült, bis die Absorption bei 280 nm bis zur Basislinie zurückgegangen war. Die Elution erfolgte mit einem Stufengradienten mit bis zu 500 mM Imidazol, wobei die verschiedenen Adhäsionsdomänen bei einer Imidazolkonzentration von 50 bis 100 mM eluiert wurden. Die Reinheit der einzelnen Fraktionen wurde mittels SDS-PAGE (siehe 3.3.1) überprüft, die hinreichend reinen Fraktionen wurden miteinander vereinigt. Anschließend wurde das Eluat mittels Ultrafiltration (siehe 3.2.6) ankonzentriert, um es anschließend per Größenausschlusschromatographie weiter zu reinigen.

Größenausschlusschromatographie

Die Größenausschlusschromatographie oder Gelfiltration^[117] dient zur weiteren Aufreinigung des nach der Affinitätschromatographie vorgereinigten Proteins. Definierte Porengrößen im Säulenmaterial, das zum Beispiel aus quervernetzter Agarose (Superdex, *GE Healthcare*) besteht, schließen Proteine größeren hydrodynamischen Durchmessers aus und ermöglichen so ein schnelleres Passieren des Säulenmaterials. So wird eine Trennung von Proteinen aufgrund ihrer apparenten Größe ermöglicht.

Zur Proteinaufreinigung wurden ausschließlich Superdex 200-Säulen (*GE Healthcare*) mit einem Säulenbettvolumen von 120 mL verwendet (XK 16-Säule, 16 mm x 600 mm), analytische Gelfiltrationen wurden mit einem Säulenbettvolumen von 3 mL (5/150 GL-Säule 5 mm x 150 mm) durchgeführt. Bei allen Gelfiltrationsläufen wurde AM-Puffer verwendet, die Flussrate betrug 1 mL/min bei der präparativen und 0.3 mL/min bei der analytischen Chromatographie. Die Reinheit der einzelnen Fraktionen wurde mittels SDS-PAGE bestimmt und die sauberen Fraktionen wurden vereinigt.

3.2.6 Konzentration von Protein durch Ultrafiltration

Ein notwendiges Ankonzentrieren der Proteinproben, etwa vor einer Größenausschlusschromatographie, Kristallisationsversuchen oder spektroskopischen Versuchen, wurde mittels Ultrafiltration erreicht. Hierzu wurden Amicon-Ultra-Konzentratoren (*Millipore*) mit einem Fassungsvermögen von 4 oder 15 mL Proteinlösung und einem Ausschlussvolumen von 10 oder 30 kDa verwendet. Das Ankonzentrieren erfolgte durch Zentrifugieren bei 3220 g und 4 °C.

3.2.7 Pufferwechsel

Pufferwechsel, die für verschiedene Experimente notwendig waren, wurden über eine spezielle Größenausschlusschromatographie durchgeführt, bei der die Ausschlussgröße des Säulenmaterials bei nur 5 kDa lag, so dass alle untersuchten Proteine im Ausschlussvolumen eluierten.

Es wurden PD-10-Säulen und PD MiniTrap G-25-Säulen (*GE Healthcare*) eingesetzt, die unter Gravitationsfluss betrieben wurden. Zunächst wurde mit 3 Säulenvolumina Zielpuffer äquilibriert, anschließend wurden 2.5 mL Proteinlösung bei einer PD-10-Säule, beziehungsweise 0.5 mL Proteinlösung bei einer G-25 Säule aufgetragen und der Durchfluss verworfen. Die Elution erfolgte mit 3.5 respektive 1 mL.

3.3 Analytische Methoden

3.3.1 SDS-PAGE

Mit der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli^[118] ist es möglich, Proteine entsprechend ihres apparenten Molekulargewichts aufzutrennen. Hierzu werden die Proteine durch das Detergenz Natriumdodecylsulfat (SDS) denaturiert und eventuell vorhandene Disulfidbrücken mittels 2-Mercaptoethanol reduziert, so dass das Protein vollständig linearisiert vorliegt und ein annähernd konstantes Masse-Ladungsverhältnis aufweist. Somit ist bei der Elektrophorese die beschleunigende Kraft für alle Proteine annähernd gleich, während die abbremssende Kraft mit der Proteinmasse ansteigt. Die SDS-PAGE wurde mit dem Mighty Small II-System (*Hoefer*) durchgeführt. Die verwendeten Gele mit einem Acrylamidgehalt von 12% im Trenngel und 4% im Sammelgel wurden mit Hilfe eines Casters hergestellt. Die hier angegebene Zusammensetzung ist für 11 Gele ausgelegt.

12% SDS-Gel	Trenngel	Sammelgel
Acryamidlösung (30%)	24 mL	3.33 mL
SDS-Lösung (10%)	600 µL	250 µL
dest. H ₂ O	15 mL	16 mL
Trenngelpuffer	20 mL	
Sammelgelpuffer		5 mL
TMEDA	60 µL	250 µL
APS (10% w/v)	300 µL	75 µL

Sammelgelpuffer	
Tris/HCl, pH6.8	0.625 M
Trenngelpuffer	
Tris/HCl, pH8.8	1.125 M
Saccharose	30%

2x SDS-Probenpuffer	
Tris/HCl, pH6.8	62.5 mM
Glycerin	15%
SDS	4% w/v
Bromphenolblau	Spatelspitze
2-Mercaptoethanol	4%

10x SDS-PAGE Laufpuffer	
Tris/HCl, pH8.8	1.125 M
Saccharose	30%

Die Proben wurden im Verhältnis 1:1 in 2x SDS-Probenpuffer aufgenommen, bei 95 °C für 5 Minuten thermisch denaturiert und nach kurzer Zentrifugation in die Taschen des SDS-Gels pipettiert. Ein zusätzlich hinzugegebener Massenstandard (*PeQLab*) ermöglichte die Zuordnung der erhaltenen Proteinbanden zu den jeweiligen Massen.

Die Elektrophorese wurde bei einer Stromstärke von 20 mA pro Gel durchgeführt. Nachdem die Lauffront das Ende des Gels erreicht hatte, wurde das Gel entnommen, das Sammelgel verworfen und das Trenngel durch Schwenken in den jeweiligen, erhitzten Bädern zunächst gefärbt und anschließend wieder entfärbt, wobei die Proteinbanden angefärbt blieben^[119]. Anschließend wurden die Gele durch Einscannen dokumentiert.

Färbelösung		Entfärbelösung	
Coomassie Brilliant Blue G250	0.25% w/v	Essigsäure	5%
Essigsäure	5%	2-Propanol	28%
Ethanol	50%		

3.3.2 Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen

Die Konzentrationsmessung von Proteinen wurde photometrisch durch eine Absorptionsmessung bei einer Wellenlänge von 280 nm durchgeführt. Bei dieser Wellenlänge absorbieren die in den Proteinen vorhandenen Aminosäuren Tryptophan, Tyrosin und die als Disulfidbrücken vorliegende Cysteine Licht und ermöglichen so eine Bestimmung der jeweiligen Konzentration nach dem Lambert-Beer'schen Gesetz^[120] (Gleichungen 3.1 bis 3.3). Der dazu nötige molare Extinktionskoeffizient (Tab. 2.7) wurde mit dem ProtParam-Server berechnet^[121].

$$E = \varepsilon \cdot c \cdot d \quad \text{Gl. 3.1}$$

$$E = \varepsilon \cdot m / (V \cdot M) \cdot d = \varepsilon \cdot c_m \cdot d / M \quad \text{Gl. 3.2}$$

$$c_m = E \cdot M / (\varepsilon \cdot d) \quad \text{Gl. 3.3}$$

E: Extinktion, ε : molarer Extinktionskoeffizient, m: Masse, c: Stoffmengenkonzentration, d: Schichtdicke,

V: Volumen, M: Molekulargewicht, c_m : Massenkonzentration

Tab.2.7: physikalisch Eigenschaften der hergestellten Proteine

Protein	theoretischer Extinktionskoeffizient / $M^{-1} \text{ cm}^{-1}$	m / Da
Flo5A	52300	29081.0
Flo11A	55256	23731.0
Σ Flo11A	58370	25588.0
LgFlo1A	45060	26626.5
Epa1A	41175	29401.6
SUN4-C	64455	31174.9

Die Absorptionsmessungen wurden mit dem Spectrophotometer ND-1000 (*Nanodrop*) durchgeführt.

3.3.3 CD-Spektroskopie

Die Fern-UV Circular dichroismus-Spektroskopie (CD-Spektroskopie) dient der Analyse der Sekundärstruktur eines Proteins^[122]. Unterschiedliche Absorption von links- und rechts-circular polarisiertem Licht bei Wellenlängen zwischen 260 und 190 nm durch das Protein-Rückgrat, ermöglicht die Vorhersage der vorliegenden Konformationen^[123]. Weiterhin lässt sich durch langsames Erwärmen einer Proteinprobe bei kontinuierlicher Messung des Circular dichroismus bei einer Wellenlänge eine Schmelzkurve erstellen, aus der die thermische Stabilität eines Proteins ermittelt werden kann.

Die Messungen wurden an einem Spectropolarimeter J-810 (*Jasco*) durchgeführt. Die Proteinlösungen hatten eine Konzentration von 1-2 mg/mL und wurden unmittelbar vor der Messung im Verhältnis 1:10 verdünnt und in eine Quarzglasküvette mit 1 mm Schichtdicke (*Hellma*) gegeben. Die Temperatur wurde während der Messung konstant auf einem Wert zwischen 4 °C und 20 °C gehalten. Eine thermische Denaturierung wurde durch Aufheizen auf 95 °C mit einem Gradienten von 2 °C/min durchgeführt, dabei wurde der Circular dichroismus bei 200 nm für Messungen von Flo5A und dessen Varianten, sowie bei 216 nm für Messungen von Flo11A und Σ Flo11A beobachtet.

3.3.4 Fluoreszenz-Spektroskopie

Bei der Fluoreszenz-Spektroskopie wird die Lichtaussendung bei der Desaktivierung eines zuvor angeregten Zustandes gemessen. Hierzu wird ein Fluorophor durch Belichtung in einen höheren elektronischen Energiezustand versetzt. Den Regeln des Franck-Condon-Prinzips gehorchend, wird dabei regelmäßig auch ein angeregter Schwingungszustand erreicht, der strahlungslos desaktiviert, bevor die elektronische Desaktivierung unter Lichtaussendung stattfindet. Daraus folgt eine Rotverschiebung des ausgestrahlten Lichts (Stokes Shift)^[124].

In dieser Arbeit wurde ausschließlich mit der Fluoreszenz der intrinsischen Aminosäure Tryptophan gearbeitet. Diese wurde bei einer Wellenlänge von 295 nm angeregt, das Fluoreszenzmaximum konnte zwischen 342 und 345 nm beobachtet werden.

Die Fluoreszenzspektroskopie wurde in Phosphatpuffer durchgeführt (0.1 M, pH 5.2). Dazu wurden 500 μ L Proteinlösung (250 μ g/mL Flo5A, 10 mM CaCl_2) in einer rührbaren Küvette vorgelegt und mit der Substratlösung (250 μ g/mL Flo5A, 10 mM CaCl_2 sowie 125 mM Mannose, 20 mM α -1,2-Mannobiose, 20 mM Man3(D1) oder 20 mM Man5(D2-D3)) titriert. Das Fluoreszenzmaximum bei 342 – 345 nm wurde aufgezeichnet und der prozentuale Fluoreszenzquench gegen die Konzentration des Substrats aufgetragen. Die Dissoziationskonstante wurde mit Gleichung 3.4 durch nicht-linearen Fit berechnet. Das

Bindungsmodell setzt eine spezifische Bindung mit einer Bindungsstelle im Verhältnis 1:1 voraus, die im untersuchten Konzentrationsbereich der Liganden auch für Flo5A angenommen werden kann.

$$Q(c) = \frac{Q_{\max} \cdot c}{K_D + c} \quad \text{Gl. 3.4}$$

$Q(c)$: prozentualer Fluoreszenzquench, Q_{\max} : maximaler Fluoreszenzquench, c : Konzentration des Liganden, K_D : Dissoziationskonstante

3.3.5 Fluoreszenzmarkierung mit AlexaFluor-488-TFP oder -SDP

Um Hochdurchsatz-Bindungsstudien durchzuführen, wurden einige Proteine fluoreszenzmarkiert. Hierfür wurde AlexaFluor-488-Tetrafluorphenylester (*Invitrogen*) oder AlexaFluor-488-Sulfodichlorophenylester (*Invitrogen*) verwendet. Diese bilden zusammen mit primären Aminen, wie sie in Lysin und am N-Terminus eines Proteins vorkommen, unter Abspaltung eines Tetrafluorphenols oder eines Sulfodichlorophenols eine Amid-Bindung.

Für die Reaktion wurden 0.5 mL des zu markierenden Proteins mit einer Konzentration von 3 bis 6 mg/mL unter Schütteln im Thermomixer mit 25 µL Fluorophorlösung (1 mg / 100 µL DMSO) versetzt und anschließend 1 h bei 20 °C und 1000 rpm inkubiert. Die Trennung von Protein und nicht abreagiertem Fluorophor erfolgte anschließend über eine G-25-Säule.

3.3.6 CFG-Analysen

Das *Consortium for Functional Glycomics* ermöglicht das Testen von verschiedensten Proteinen auf Kohlenhydratbindungseigenschaften mit Hilfe eines mit synthetisch hergestellten Polyglycanen bedruckten Glaschips. Auf der aktuellen Version 5.0 dieses *Glycan Arrays* liegen 611 verschiedene Kohlenhydrate auf der Oberfläche vor, in der in dieser Arbeit verwendeten Version 3.1 und Version 4.1 waren es noch 377 beziehungsweise 465^[125]. Zur Identifikation von möglichen Bindungspartnern wurde das jeweilige rekombinante Protein mit einem Fluoreszenzfarbstoff konjugiert (siehe 3.3.7) und mit einem definierten Puffer (20 mM Tris/HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, 2 mM CaCl₂, 2 mM MgCl₂, 0,05% TWEEN 20, 1% BSA) auf 200 µg/mL verdünnt. Anschließend wurde diese Lösung 2 h auf der Oberfläche des *Glycan Arrays* inkubiert. Eine anschließende Fluoreszenzauslesung erlaubt die Detektion der gebundenen Glycane. Da pro Glycan 6 Messpunkte vorhanden sind, können die Extrema verworfen und aus den verbleibenden 4 Messwerten ein Mittelwert gebildet werden.

In dieser Arbeit wurden Proben von Flo11A und Σ Flo11A, die an freien Aminogruppen mit AlexaFluor 488 markiert worden waren (Abbildung 2.1), durch das CFG analysiert. Dabei kamen sowohl rekombinante A-Domänen mit His-tag als auch solche, bei denen der His-tag durch Thrombin abgespalten worden war, zum Einsatz.

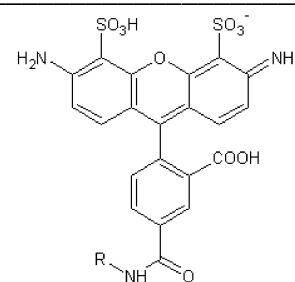


Abb.3.1: AlexaFluor 488
konjugiert an ein primäres Amin

3.4 Methoden zur Bestimmung der dreidimensionalen Struktur von Proteinen

Heutzutage existieren einige Möglichkeiten zur Bestimmung der dreidimensionalen Struktur eines Proteins. Durch Experimente wie Kleinwinkelröntgenstreuung (*small angle X-Ray-Scattering*, SAXS)^[126] oder durch Cryoelektronenmikroskopie^[127] können hauptsächlich Umhüllende eines Proteins erhalten werden. Dies ist hilfreich, wenn die Quartärstruktur eines Proteinkomplexes nicht bekannt ist, so dass etwaig vorhandene Tertiärstrukturen der beteiligten Proteine in die Umhüllende eingebaut werden können. Um atomar aufgelöste Strukturen zu erhalten, sind diese Methoden bisher nicht geeignet. Durch NMR an Proteinen ist es möglich die Struktur kleinerer Proteine bis hin zu circa 30 kDa zu erhalten^[128, 129]. In Hochdurchsatzansätzen können bisher Proteine bis zu 20 kDa gelöst werden^[130]. Dafür wird routinemäßig das Protein mit ¹⁵N- und ¹³C-Isotopen markiert und multidimensionale Spektren (z.B. COSY, NOESY) werden davon aufgenommen. Zusammen mit der Verwendung bekannter *restraints*, wie Bindungslängen und Winkeln, ist es möglich, ein Ensemble an Strukturen zu berechnen, das die Aufenthaltswahrscheinlichkeit der Proteinatome angibt. In rigiden Bereichen des Proteins liegen alle Atome des Ensembles dicht beieinander, während sie in flexiblen Bereichen zum Teil stark divergieren.

Während in der weltweiten Proteindatenbank (wwPDB)^[131] momentan (10. April 2012) 45 Strukturen aus SAXS-Experimenten, 424 Strukturen aus Cryo-EM-Experimenten und 9331 Strukturen aus NMR-Experimenten hinterlegt sind, ist die dominante Technik zur Strukturlösung eindeutig die Röntgenkristallographie mit momentan 70584 Strukturen.

Die Vorteile der Röntgenkristallographie sind sehr hohe erreichbare Auflösungen von derzeit maximal 0.48 Å^[132], keine Notwendigkeit, die strukturell aufzuklärenden Proteine zu modifizieren, sowie die Möglichkeit auch sehr große Proteine oder Proteinkomplexe zu charakterisieren. Ein Nachteil ist, dass durch die Kristallbildung die native Konformation des Proteins verändert werden könnte. Da Proteinkristalle aber einen Lösungsmittelgehalt von

circa 50% aufweisen, liegt das Protein in einer nahezu natürlichen Umgebung vor und eine relevante Artefaktbildung tritt nur selten auf^[133]. Allerdings ist es möglich, dass durch die Kristallpackung Störungen in der Substraterkennung auftreten^[134]. Der größte Nachteil allerdings ist die Notwendigkeit, wohlgeordnete Proteinkristalle zu erhalten, an denen Streuexperimente durchgeführt werden können.

3.4.1 Kristallisationsscreening

Da bisher keine verlässliche Möglichkeit besteht, vorherzusagen unter welchen Bedingungen aus einem bestimmten Protein Kristalle entstehen, werden in einem ersten Schritt eine große Menge an Kristallisationsbedingungen getestet, die bereits zuvor in vielen anderen Fällen zur Proteinkristallbildung geführt haben, die so genannten *sparse-matrix-screens*^[135]. Das Wachstum der strukturgenomischen Initiativen, wie zum Beispiel des JCSG (*Joint Center for Structural Genomics*), hat dazu geführt, dass in den letzten Jahren immer weiter verbesserte *sparse-matrix-screens* zur Verfügung gestellt worden sind^[136].

In dieser Arbeit wurden die *sparse-matrix-screens* EasyXtal Classics Suite, MBClass Suite, MBClass II Suite, JCSG+ Suite, JCSG Core I-IV Suites und der systematische *screen* PACT Suite (alle *QIAGEN*) eingesetzt. Alle Ansätze wurden im *sitting-drop* durchgeführt, einem auf Dampfdiffusion basierenden Verfahren^[137], bei dem die Proteinlösung im Verhältnis eins zu eins mit der Präzipitanslösung gemischt wird und während der Inkubationszeit mit dem Präzipitanslösungsreservoir über die Dampfphase äquilibriert. Durch die höhere Salzkonzentration im Reservoir diffundieren Lösungsmittelmoleküle aus den Proteintropfen in das Reservoir und die Konzentration an Protein und Präzipitans nimmt im Proteintropfen zu. Im Idealfall wird so eine übersättigte, metastabile Lösung erhalten, in der zunächst Kristallkeime entstehen, die dann zu makroskopischen Proteinkristallen wachsen.

Es wurden automatisiert 300 nL Proteinlösung mit einer Proteinkonzentration von 15 bis 80 mg/mL mit 300 nL der jeweiligen Präzipitanslösung in 96 *well* Innovaplates (*Innovadyne*) gemischt. Da die verwendete Kristallisationsplatte zwei Vertiefungen für die Aufnahme von Proteintropfen hat, wurde entweder ein Kontrolltropfen nur mit dem Puffer, in dem das Protein gelöst war, gesetzt oder die Proteinkonzentration im zweiten Tropfen wurde um die Hälfte verringert. Im Reservoir lagen immer 80 µL der Präzipitanslösung vor.

Nachdem die Kristallisationsansätze pipettiert waren, wurde die Platte mit einem *ViewSeal* verschlossen und bei 4 °C oder 18 °C inkubiert. Die Dokumentation erfolgte manuell an einem Lichtmikroskop oder automatisiert mit Hilfe des Rockimager-Dokumentationssystems (*Formulatrix*).

3.4.2 Optimierung der Proteinkristallisation

Werden Proteinkristalle in *sparse-matrix-screens* erhalten, so weisen diese häufig noch nicht die für ein Röntgendiffraktionsexperiment notwendigen Eigenschaften wie ausreichende Kristallgröße und Einkristallinität auf. Auch können die Streueigenschaften, die durch die Ordnung des Kristalls, ausgedrückt in der Mosaizität, bestimmt werden, durch optimierte Kristallisationsbedingungen häufig verbessert werden.

Zur Optimierung der aus den automatisierten *screens* erhaltenen Kristallisationsbedingungen wurden die Konzentrationen der Puffersubstanz, des Präzipitans und eines eventuell vorhandenen Salzes systematisch um die Ausgangsbedingung herum variiert. Ebenso wurde der pH-Wert der Präzipitanslösung in Stufen von 0.1 bis 0.2 um bis zu zwei pH-Einheiten verändert. Die Optimierungsscreens wurden teilweise, ebenso wie die *sparse-matrix-screens*, durch den Pipettierroboter Cartesian MicroSys 4000-XL in 96-well Platten im *sitting-drop*-Verfahren als auch manuell in 24-well-EasyXtal Platten (*Qiagen*) im *hanging-drop*-Verfahren pipettiert. Bei diesem Verfahren wurde 1 mL der Präzipitanslösung im Reservoir vorgelegt und 1 bis 2 µL Proteinlösung mit 1 bis 2 µL Präzipitanslösung auf einem silikonisierten Deckglas vermischt und das Reservoir mit diesem verschlossen, so dass der Proteintropfen über dem Reservoir hing. Die Dokumentation erfolgte manuell an einem Lichtmikroskop.

3.4.3 Microseeding

Da die Nukleation von Proteinkristallen ein vom Kristallwachstum nahezu unabhängiger Prozess ist und eine hohe Übersättigung der Proteinlösung erfordert, während das Wachstum von wohlgeordneten Proteinkristallen durch eine niedrige Übersättigung begünstigt wird, kann es sinnvoll sein, beide Prozesse zu entkoppeln und in Kristallisationstropfen einzelne Nuklei einzubringen^[138]. Dies können Fremdkörper wie Fasern oder Glasstaub sein, klassisch werden die *seeds* aber aus bereits vorhandenen Kristallen des Proteins hergestellt, das kristallisiert werden soll.

In dieser Arbeit war es bei der Kristallisation von Flo11A notwendig, die Nukleation zu umgehen und vorgeformte Nuklei in die Kristallisationsbedingungen einzubringen. Hierzu wurde ein Teil des einzigen, spontan gewachsenen Flo11A-Kristalls zusammen mit 10 µL seiner Mutterlauge in ein Eppendorf-Gefäß überführt, eine Stahlkugel (Durchmesser 3 mm) hinzugegeben und durch kurzes Vortexieren zerkleinert. Die entstandene Lösung enthielt unter dem Binokular nicht mehr sichtbare *seeds*, die mit Hilfe eines Katzen-Schnurrhaars in frisch pipettierte Kristallisationsansätze eingebracht wurden. Dabei wurden bis zu drei identische Tropfen nacheinander mit dem Schnurrhaar durchstrichen, bevor neue *seeds*

aufgenommen wurden, um Tropfen zu erhalten, in die nur ein oder zwei Nuklei eingebracht wurden.

3.4.4 Vorbereiten der Kristalle

Kristalle, die für Röntgenbeugungsexperimente tauglich erschienen, wurden mit Hilfe von CryoLoops (*Hampton Research*) oder MicroMounts (*MiTeGen*) unter einem Lichtmikroskop aus ihrer Mutterlauge entnommen. Flo11A und SUN4 Kristalle konnten direkt in flüssigem Stickstoff eingefroren werden, da sie einer Bedingung mit hoher PEG400 Konzentration entstammten, welches als Cryoprotektant dient und daher für ein Einfrieren ohne Bildung von Wassereiskristallen sorgt. Bei Flo5A wurde zu diesem Zweck der Mutterlauge 15%, bei Epa1 20% Glycerin zugesetzt, sowie die Kristalle kurze Zeit darin *gesoakt*, bevor auch sie in flüssigem Stickstoff eingefroren wurden.

3.4.5 Soaking von Kristallen mit Schwermetallen

Zur Lösung des Phasenproblems können definiert in das Protein inkorporierte (siehe 3.4.9) Schwermetallionen verwendet werden, die ein anomales oder isomorphes Signal erzeugen.

Um dies zu erreichen wurden Kristalle von Flo5A und SUN4 in dem in Tabelle 2.8 angegebenen Gadolinium-*Soaking*-Puffer für verschiedene Zeiträume inkubiert.

Tab.2.8 Gd-*Soaking*-Puffer

BisTris Propan, pH7.5	100 mM
NaCl	500 mM
PEG4000	20%
GdAc ₃	50 mM

Anschließend wurden die Kristalle kurz in einen Gadolinium-*Soaking*-Puffer mit 15% zugesetztem Glycerin als Cryoprotektant gegeben und in flüssigem Stickstoff eingefroren.

3.4.6 Soaking von Kristallen mit potentiellen Kohlenhydrat-Liganden

Wenn Anhaltspunkte vorliegen, dass bestimmte Kleinmoleküle als Ligand eines Proteins fungieren, besteht die Möglichkeit, diese Kleinmoleküle ebenfalls in zuvor geformte Kristalle zu *soaken* und durch die Röntgenstrukturaufklärung die Bindung des Liganden an das Protein zu charakterisieren^[139]. Dies wird häufig ausgenutzt, um Inhibitoren für Proteine zu entwickeln und zu charakterisieren, die als Pathogenizitätsfaktor fungieren, wie zum Beispiel bei der HIV-1-Protease^[140].

Im Fall der in dieser Arbeit untersuchten Proteine wurden *soakings* mit verschiedenen Kohlenhydraten durchgeführt, die als Ligand in Frage kamen. Dies waren im Fall von Flo5A Mannose, Glucose, α -1,2-, α -1,3- und α -1,6-Mannobiosen sowie die Polymannoside Man3(D1) und Man5 (D2-D3) (*Carlo Unverzagt, Universität Bayreuth*). Im Fall von Flo11A wurden *soakings* mit Mannose, Glucose und N-Acetylgalactosamin durchgeführt, bei SUN4 *soakings* mit Mannose und Glucose.

Zum *soaken* wurden Kristalle aus ihren Mutterlaugen entnommen und in entsprechende Lösungen gelegt, die mit verschiedenen Substraten versetzt waren. Hierbei kamen Konzentrationen von 16.6 mM für einzelne Mannobiosen bis hin zu 2 M für Mannose zum Einsatz. Die hochkonzentrierten Kohlenhydratlösungen fungierten gleichzeitig als Cryoprotektant, bei den niedrig konzentrierten Lösungen wurden die Kristalle abschließend noch in Lösungen inkubiert die zusätzlich zum Kohlenhydrat 15% Glycerin enthielten.

3.4.7 Röntgenbeugung

Die eingefrorenen und gegebenenfalls zuvor *gesoakten* Kristalle konnten nun für Röntgenbeugungsexperimente verwendet werden. Dazu wurden sie entweder an einer Röntgendrehanode FR591 (*Bruker AXS*) mit Kupfer als Targetanode (Wellenlänge der erzeugten Röntgenstrahlung $\lambda=1.5418$) oder an einem Messplatz der Europäischen Synchrotronstrahleneinrichtung (*European Synchrotron Radiation Facility, ESRF*) auf einen Goniometerkopf montiert und im Röntgenstrahl ausgerichtet. Während der Messung wurden die Kristalle durch einen Kaltgasstrahl auf 100 K temperiert. Diese Kryokristallographie erlaubt die Aufnahme von zum Teil mehreren Datensätzen eines einzigen Kristalls, da die durch die Röntgenstrahlung erzeugten schädigenden Einflüsse wie Hitze oder Radikale unter Kryo-Bedingungen weitaus langsamer zur Erhöhung der Unordnung innerhalb des Kristallgitters beitragen können.

Nach Aufnahme und Indizierung von zwei Testbildern, die im Winkel von 90° zueinander aufgenommen wurden, konnten mit Hilfe der Software *imosflm*^[141, 142] oder *EDNA*^[143] die Zellparameter und Raumgruppen der Kristalle bestimmt und aus diesen Strategien berechnet werden, um von einem Kristall einen möglichst vollständigen, hoch aufgelösten Datensatz zu sammeln. Hierzu wurden die Belichtungszeiten und der Oszillationswinkel, um den der Kristall während der Aufnahme eines Bildes gedreht wurde, variiert (0.1 s – 20 min, 0.1 ° - 1.0 °). Es war teilweise notwendig, je einen Datensatz hoher sowie niedriger Auflösung aufzunehmen, um das Potential stark streuender Kristalle auszunutzen, ohne schwach gebeugte Reflexe durch Überexposition des Detektors für diese zu verlieren. Diese Datensätze wurden im Laufe der Prozessierung wieder vereinigt.

3.4.8 Prozessierung

Die Integration der gemessenen Reflexe wurde im Regelfall mit dem Programm *XDS*^[144], in Ausnahmefällen auch mit dem Programm *imosflm*^[141, 142] vorgenommen. Jeder Reflex *hkl* wird dabei erfasst, Korrekturen verschiedener Parameter wie Strahlposition, Detektorabstand, Kristallmosaizität und genaue Zellparameter eingerechnet und die Intensität des Reflexes bestimmt. Hierbei wurden die Qualitätsparameter Vollständigkeit, also der Anteil der möglichen Reflexe, die beobachtet wurden; R_{merge} , der den Intensitätsunterschied zwischen symmetrieäquivalenten Reflektionen angibt, sowie der Rauschabstand $I/\sigma(I)$ berechnet.

Das *mergen*, also das Zusammenfassen der symmetrieäquivalenten Reflexe und das Skalieren erfolgte mit *XSCALE*^[144] beziehungsweise *SCALA*^[145] aus dem CCP4-Paket^[146]. In diesem Schritt wurden aus Gründen der maximalen Auflösung getrennt aufgenommene Datensätze wieder zusammengefügt. Die maximale Auflösung bis zu der ein Datensatz sinnvolle Informationen liefert, wurde ebenfalls in diesem Schritt bestimmt. Dazu wurden verschiedene Qualitätsparameter herangezogen. Es wurde vor allem darauf geachtet, dass der Wilson-Plot zu hoher Auflösung hin einen linearen Verlauf zeigte, der Rauschabstand $I/\sigma(I)$ in der höchsten Auflösungsschale einen Wert von 2 nicht unterschritt und der R_{merge} -Wert, in der höchsten Auflösungsschale nicht über 70% anstieg.

3.4.9 Strukturlösung – Bestimmung der Phasen

Die Elektronendichte in einer Einheitszelle lässt sich durch Gleichung 3.5, mit V als Volumen der Einheitszelle, beschreiben.

$$\rho(x, y, z) = \frac{1}{V} \sum_h \sum_k \sum_l F_{hkl} e^{-2\pi i(hx+ky+lz)} \quad \text{Gl. 3.5}$$

Diese stellt eine Fouriersumme aus allen Strukturfaktoren F_{hkl} dar, die jeweils eine einzelne Reflektion beschreiben. Da F_{hkl} eine Wellenfunktion darstellt, kann sie durch die Terme Frequenz, Amplitude und Phase beschrieben werden. Die Amplitude $|F_{hkl}|$ ist proportional zu $(I_{hkl})^{1/2}$, kann also aus den vom Röntgendetektor aufgezeichneten Reflexen ermittelt werden. Die Phase α_{hkl} , mit der der gebeugte Röntgenstrahl auf den Detektor trifft, lässt sich nicht experimentell bestimmen, so dass aus den Daten, die bei einem Röntgenbeugungsexperiment erhalten werden, nicht direkt Elektronendichtekarten berechnet werden können. Die Bestimmung der Phasen muss also über Umwege geschehen. Hierfür wurden in der Vergangenheit einige Methoden etabliert^[112, 147-150], von denen in dieser Arbeit verschiedene angewendet wurden.

Bei Flo5A konnten erste Phasen erfolgreich mit SIRAS (*single isomorphous replacement with anomalous scattering*) ermittelt werden, bei Epa1A war ein Molekularer Ersatz (*molecular replacement*, MR) mit einer passend zugeschnittenen Flo5A-Struktur erfolgreich, bei Flo11A kam MAD (*multiple wavelength anomalous dispersion*) zum Einsatz und SUN4 ließ sich mittels SAD (*single wavelength anomalous dispersion*) phasieren. Bei den experimentell ermittelten Phasen kamen die Programme *SHELXC*, *SHELXD* und *SHELXE*^[151] zum Einsatz, der molekulare Ersatz wurde mit dem Programm *Phaser*^[152] durchgeführt.

Der Isomorphe Ersatz beruht auf der Tatsache, dass alle Atome in der Einheitszelle einen Beitrag zu jedem Reflex liefern. Wenn es also gelingt eine definierte Änderung in jede Einheitszelle eines Proteinkristalls einzubringen, wird sich jeder beobachtete Reflex ein wenig ändern. Damit diese Änderung ausreichend stark ist um nicht im Rauschen unterzugehen, wird versucht, ein elektronenreiches Atom und damit einen starken Streuer, in das Protein einzubringen. Dies wird häufig durch *soaking* von vorgeformten Kristallen in Schwermetalllösungen erreicht.

Da der Strukturfaktor eines Reflexes des Schweratomderivats F_{PH} sich idealerweise aus den Strukturfaktoren des gleichen Reflexes in einem nativen, isomorphen Datensatz F_P und einem Strukturfaktor des Schweratoms F_H zusammensetzt gilt:

$$F_{PH}=F_P+F_H \quad \Leftrightarrow \quad F_P=F_{PH}-F_H \quad \text{Gl.3.6}$$

Da der Strukturfaktor der Schweratomsstruktur F_H sich aufgrund der geringen Komplexität mit der Patterson-Methode^[153] oder mit direkten Methoden relativ leicht bestimmen lässt und die Intensitätsanteile von F_{PH} und F_P bekannt sind, lassen sich mit Hilfe der Harker-Konstruktion^[154] für jeden Reflex zwei mögliche Phasen berechnen. Diese Methode wird *single isomorphous replacement*, einzelner isomorpher Ersatz, genannt. Durch Vergleich eines nativen Datensatzes mit zwei oder mehreren verschiedenen, isomorphen Schweratomderivaten lässt sich für jeden Reflex eine eindeutige Phase berechnen. Diese Methode wäre das *multiple isomorphous replacement*, der multiple isomorphe Ersatz^[155].

Die Methode der anomalen Dispersion beruht auf der Absorption von Röntgenstrahlung durch Schweratome bei einer definierten Wellenlänge. Durch diese Absorption in der Nähe einer Absorptionskante eines Schweratoms gilt Friedels Gesetz nicht mehr, welches besagt, dass ein Reflex hkl die gleiche Intensität aufweist wie der zum Ursprung inverse Reflex $-h-k-l$. Durch die Absorption und Reemission von Röntgenstrahlung durch Schweratome werden sowohl Intensität als auch die Phase aller Reflexe verändert. Diese Änderung beruht

wiederum allein auf der Position des Schweratoms in der Einheitszelle, welche durch Patterson-Methoden^[153] ermittelt werden kann. Mit Hilfe einer analogen Harker-Konstruktion^[154] können nun aus der Amplitude eines Reflexes hkl und den aus der Schweratomposition bekannten anomalen Streubeiträgen ΔF_r und ΔF_i zwei mögliche Phasen α_{hkl} berechnet werden (*single wavelength anomalous dispersion*, SAD). Die Zweideutigkeit kann durch einen zweiten Datensatz bei einer anderen Wellenlänge in der Nähe der Absorptionskante aufgehoben werden (*multiple wavelength anomalous dispersion*, MAD)^[155]. Mit Hilfe der SAD-Methode war es in dieser Arbeit auch möglich, genauere Schweratompositionen innerhalb einer Proteinstruktur festzustellen, indem die anomalen Differenzdichten von Elektronendichtekarten erstellt wurden.

Die SIRAS-Methode (*single isomorphous replacement with anomalous scattering*) ist eine Kombination des isomorphen Ersatzes und der anomalen Dispersion zur Bestimmung der Phasen.

Eine weitere Methode das Phasenproblem zu lösen ist der Molekulare Ersatz (*molecular replacement*, MR)^[156]. Hierbei werden die Phasen einer bereits bekannten Struktur verwendet, bei der man von einer strukturellen Ähnlichkeit zur zu lösenden Proteinstruktur ausgeht. Diese Annahme kann auf einer verwandten Proteinsequenz, Funktion oder ähnlichem beruhen. Es wird allerdings davon ausgegangen, dass MR besonders bei Sequenzidentitäten über 30% Erfolg versprechend ist, aber auch Suchmodelle mit 20% Sequenzidentität können zum Erfolg führen^[157]. Das Suchmodell wird in der Regel angepasst, indem hervorstehende Schleifen oder andere Bereiche entfernt werden, die in der zu lösenden Struktur nicht erwartet werden. Durch die gängigen MR-Programme wird das Problem von sechs Freiheitsgraden in denen das Suchmodell bewegt werden muss auf zwei mal drei Freiheitsgrade herunter gebrochen. Zunächst wird das Suchmodell um alle drei Raumachsen rotiert und die beste Position durch *maximum-likelihood*-Algorithmen festgestellt, danach wird das ideal positionierte Modell in alle drei Raumrichtungen translatiert und wiederum durch *maximum-likelihood*-Algorithmen die am besten zu den experimentellen Daten passende Position bestimmt. Als Qualitätsmerkmal wird der *Z-Score* berechnet, der sich aus dem logarithmischen *likelihood gain* (LLG_L) der gefundenen Lösung abzüglich einem logarithmischen *likelihood gain* (LLG_R) einer zufälligen Orientierung, geteilt durch die Standardabweichung einer zufälligen Auswahl an LLG -Werten vom Mittel zusammensetzt (Gleichung 3.7).

$$Z = \frac{LLG_L - LLG_R}{RMSD(LLG)} \quad \text{Gl.3.7}$$

Da der Informationsgehalt der Phase eines Reflexes weitaus höher ist, als der Informationsgehalt der Intensität dieses Reflexes^[158], muss bei der Strukturlösung, insbesondere wenn Molekularer Ersatz zum Berechnen der Phasen genutzt wird, vorsichtig vorgegangen werden, um einen verfälschenden Einfluss des Suchmodells auf die Strukturlösung zu vermeiden.

Nachdem erste experimentelle Phasen erhalten worden waren, konnte ein erstes Modell der jeweiligen Struktur automatisiert mittels ARP/wARP^[159] gebaut werden.

3.4.10 Verfeinerung

Die Verfeinerung der Strukturen erfolgte mit den Programmen *cool*^[160] für den manuellen Modellbau und *refmac5*^[161] für die automatische Verfeinerung. Die Verfeinerung wurde nach dem Prinzip des *maximum likelihood gain* durchgeführt, als Qualitätsparameter wurden die R_{work} und R_{free} Faktoren bestimmt, die angeben, wie gut die aus dem Modell berechneten Strukturfaktoramplituden $|F_{\text{calc}}|$ zu den experimentell beobachteten Strukturfaktoramplituden $|F_{\text{obs}}|$ passen (Gl. 3.8). Dabei gibt R_{work} den Wert für die bei der Verfeinerung verwendeten Reflexe an, während R_{free} den Wert für Testreflexe angibt, die niemals in der Strukturbestimmung verwendet wurden^[162]. Diese Testreflexe werden direkt nach der Skalierung festgelegt und bestehen aus circa 5% der gemessenen Reflexe. Sie werden für jeden weiteren Datensatz derselben Kristallform übernommen.

$$R = \frac{\sum ||F_{\text{obs}}| - |F_{\text{calc}}||}{\sum |F_{\text{obs}}|} \quad \text{Gl. 3.8}$$

3.4.11 Darstellung der Strukturen

Sämtliche Abbildungen von Proteinstrukturen in dieser Arbeit wurden mit dem Programm *PyMOL*^[163] erstellt. Zur Berechnung von elektrostatischen Oberflächen wurde das Plugin *APBS*^[164] und zur Berechnung hydrophober Oberflächen das Plugin *VASCO*^[165] verwendet.

4 Ergebnisse

In Abbildung 4.1 ist ein Überblick über die in dieser Arbeit hauptsächlich untersuchten Hefezellwandproteine gegeben. Flo5 ist ein GPI-verankertes Zellwandprotein aus *S.cerevisiae*, das für die Zell-Zell-Adhäsion über homotypische Interaktion verantwortlich ist. Das Flo5-Homolog Epa1 dagegen sorgt für heterotypische Interaktionen zwischen der pathogenen Hefe *C. glabrata* und ihren Wirtszellen. Flo11 wird bisher als verantwortlich für die Adhäsion von Hefen an abiotische Oberflächen verantwortlich gemacht. Die Adhäsine Flo5, Epa1 und Flo11 weisen eine gemeinsame Domänenstruktur auf. Untersucht wurden in dieser Arbeit die N-terminalen A-Domänen, während die repetitiven, serin- und threoninreichen B-Domänen, wie auch die C-Domänen außer Acht gelassen wurden.

Von der für den Zellwandaufbau wichtigen, möglichen Glycosidase Sun4 wurde die C-terminale SUN-Domäne untersucht, während der N-terminale serin- und threoninreiche Bereich vermutlich keine definierte Struktur aufweist und im Folgenden nicht berücksichtigt wurde.

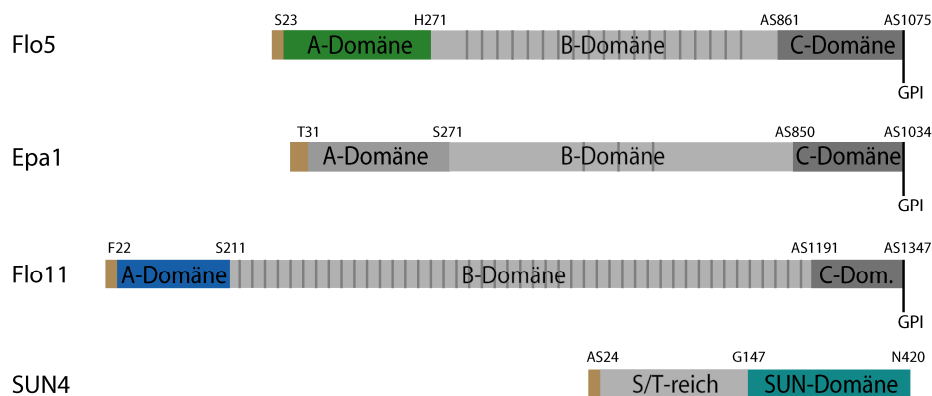


Abb.4.1: Überblick über die untersuchten Hefezellwanddomänen. Von den Adhäsinen Flo5, Epa1 und Flo11 wurden die N-terminalen A-Domänen produziert und untersucht, von der möglichen Glycosidase Sun4 die C-terminale SUN-Domäne. Alle Proteine werden sekretiert, was durch die N-terminale Signalsequenz (braun) angezeigt wird.

In Tabelle 4.1 sind Informationen über die verwendeten Konstrukte zusammengefasst. Es sind zwei weitere untersuchte Adhäsine, LgFlo1A und Σ Flo11A, aufgeführt, die Ähnlichkeiten zu Flo5A und Flo11A aufweisen.

Tab.4.1: Übersicht über untersuchte Hefezellwanddomänen

Protein	Organismus	UniProt-ID	Aminosäuren	molare Masse / Da	mol. Masse mit His-tag / Da
Flo5A	<i>S. cerevisiae</i> S288c	P38894	S23 – H271	26786.5	29081.0
Epa1A	<i>C. glabrata</i> CBS138	Q6VBJ0	T31 – S271	27107.1	29401.6
LgFlo1A	<i>S. pastorianus</i>	B3IUB3	G24 – H244	24332.0	26626.5
Flo11A	<i>S. cerevisiae</i> S288c	P08640	F22 – S211	21436.5	23731.0
Σ Flo11A	<i>S. cerevisiae</i> Σ 1278b	E9P9G2	F22 – P226	23293.5	25588.0
Sun4-C	<i>S. cerevisiae</i> S288c	P53616	G147 - N420	28897.4	31174.9

4.1 Struktur und Funktion der Flo5A-Domäne

4.1.1 Klonierung der Expressionskonstrukte von Flo5A und Flo5A-Varianten

Die Klonierung des Expressionskonstruktes pET28a-Flo5A wurde bereits in früheren Arbeiten durchgeführt^[105]. Die Herstellung der verschiedenen Expressionskonstrukte der strukturbasierten Mutanten oblag Dr. Stefan Brückner.

4.1.2 Produktion und Aufreinigung von Flo5A und Flo5A-Varianten

Nach der Produktion von Flo5A in Origami2 *E. coli* Zellen oder von verschiedenen Flo5A-Mutanten in SHuffle T7 Express *E. coli* Zellen bei 12 °C, Aufschluss der Zellen mittels French-Press und Klärung des Lysats durch Zentrifugation und Sterilfiltration war der erste chromatographische Schritt die Aufreinigung mittels Ni-NTA-Affinitätschromatographie. Bei einigen Varianten von Flo5A wurde bereits bei diesem Schritt deutlich, dass die jeweils eingebrachte Mutation nicht mit einer nativen Proteinfaltung unter den verwendeten Bedingungen kompatibel war.

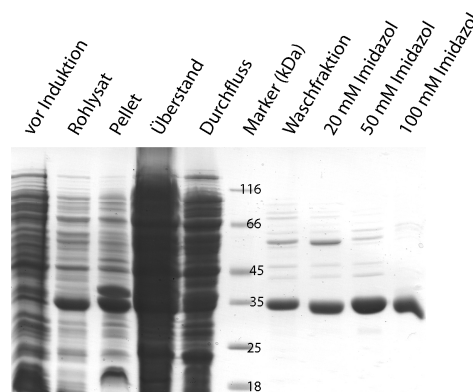


Abb.4.2: Reduzierende SDS-PAGE der präparativen Produktion und Aufreinigung von Flo5A durch Ni-NTA-Affinitätschromatographie. Bei einer Imidazolkonzentration von 50 mM wird annähernd sauberes Flo5A erhalten

Wie in Abbildung 4.2 zu sehen ist, ließ Flo5A sich mit Hilfe der Ni-NTA-Chromatographie weitgehend reinigen. Eine anschließende Gelfiltration lieferte reines, monodisperses Protein mit einer Ausbeute von 22.5 mg/L Expressionskultur. Dieses konnte bei 4 °C über einen Zeitraum von mehreren Wochen gelagert werden.

In Abbildung 4.3 sind Löslichkeitsstudien der untersuchten Flo5A Varianten gezeigt. Es ist zu sehen, dass die Varianten Flo5A-D202T, Flo5A-Y222F und Flo5A-S227A löslich produziert wurden, während die Varianten Flo5A-Q98A, Flo5A-K194A und Flo5A-W228L nur zu einem geringen Anteil in der löslichen Fraktion vorlagen. Die Mutanten der

Calciumbindungsstelle, Flo5A-N224A sowie Flo5A-D160A/D161A, lagen ausschließlich als *inclusion bodies* vor.

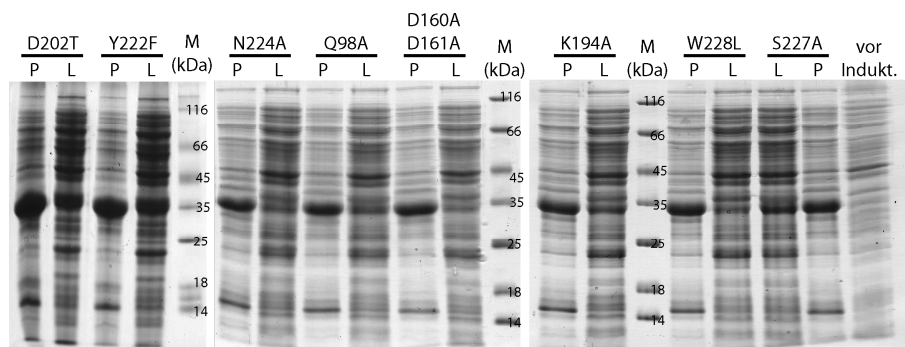


Abb.4.3: Reduzierende SDS-PAGE der Löslichkeitstests verschiedener Flo5A Varianten (P: Pellet, L: löslich). Flo5A-D202T, -Y222F und -S227A werden löslich produziert, Flo5A-Q98A, -K194A und -W228L sind wenig löslich und Flo5A-N224A sowie Flo5A-D160A/D161A liegen praktisch unlöslich vor.

4.1.3 Kristallisation der Flo5A-Domäne

Erste Kristalle von Flo5A konnten bereits in früheren Arbeiten erhalten werden^[105]. Die Anfangsbedingungen, die im Weiteren verfeinert wurden, waren Bedingung 72 aus dem kommerziellen Screen MBC I und Bedingung 3 aus dem kommerziellen Screen JCSG+. Flo5A lag bei allen Kristallisationsversuchen in AM-Puffer in einer Konzentration von 15 bis 30 mg/mL vor.

Tab.4.2: Kristallisationsbedingen für Flo5A

MBC I, Bed. 72		JCSG+, Bed. 3	
BisTrisPropan	0.1 M; pH7.0	(NH ₄) ₂ HCitrat	0.2 M, pH5.0
PEG4000	20%	PEG3350	20%
NaCl	0.5 M		

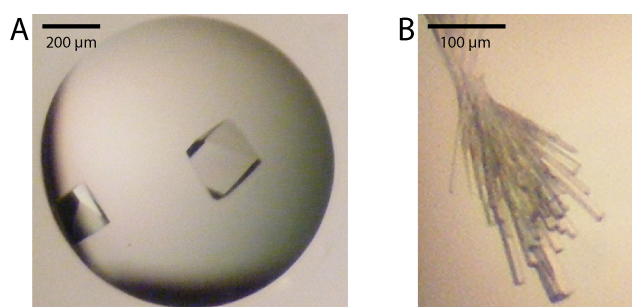


Abb.4.4: **A:** Kristallform I aus MBC I, Bed. 72, erhalten nach 3 Tagen. **B:** Kristallform II aus JCSG+, Bed. 3, erhalten nach 1 Tag.

Die Kristalle aus MBC I, Bedingung 72 und den daraus abgeleiteten Bedingungen zeigten eine orthorhombische, dreidimensionale Form (Kristallform I), während die Kristalle aus JCSG+, Bedingung 3 eine trigonale, nadelförmige Morphologie aufwiesen (Kristallform II). Von beiden Kristallformen wurden Datensätze aufgenommen. Aufgrund des besseren

Streuverhaltens und der für Bindungsstudien geeigneteren Kristallpackung, wurden für die weiteren Experimente ausschließlich Kristalle der Kristallform I verwendet.

4.1.4 Phasierung von Flo5A durch SIRAS

Um erste Phasen für die Strukturbestimmung von Flo5A zu erhalten wurde das SIRAS-Verfahren (*Single Isomorphous Replacement with Anomalous Scattering*) angewendet. Hierbei wird sowohl das isomorphe als auch das anomale Signal zur Phasierung der Daten genutzt. Voraussetzung sind ein Datensatz eines nativen Kristalls und ein Datensatz eines mit einem Schwermetall derivatisierten, isomorphen Kristalls. Die Wellenlänge der für den Derivat-Datensatz verwendeten Röntgenstrahlung muss in der Nähe einer Absorptionskante des verwendeten Schwermetalls liegen.

Tab.4.3: Datensammlungsstatistiken Flo5A

Datensatz	nativ, MV111	Derivat, MV113
Datum	20.10.2008	22.10.2008
Röntgenquelle	FR591	FR591
Wellenlänge (Å)	1.5418	1.5418
Detektor	MAR345	MAR345
Temperatur (K)	100	100
Raumgruppe	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁
Zellmaße (Å)		
a	46.3	46.3
b	63.4	63.6
c	105.4	105.2
α, β, γ	90°, 90°, 90°	90°, 90°, 90°
Moleküle / a.s.u.	1	1
Auflösung (Å)	19.62 – 1.87 (1.97 – 1.87)	19.66 – 2.04 (2.15 – 2.04)
beobachtete Reflexe	89571	66598
einzigartige Reflexe	26109	19980
Vollständigkeit (%)	98.6 (93.3)	98.3
Multiplizität	3.4 (3.2)	3.3 (3.1)
Mittleres I/σ(I)	33.7 (12.9)	12.9 (4.5)
R _{merge} (%)	2.6 (10.5)	7.0 (29.7)
anomale Vollständigkeit (%)	/	94.8 (88.7)
anomale Multiplizität	/	1.8 (1.7)
anomale Korrelation (%)	/	69.5 (7.4)

Im Fall der Flo5A-Domäne kamen ein nativer Datensatz und ein Datensatz eines Gadolinium-Derivats von Flo5A zum Einsatz. Das Gadolinium-Derivat wurde durch *soaken* eines zuvor geformten Flo5A-Kristalls in seiner Mutterlauge mit Zusatz von 50 mM GdAc₃ für 24 h hergestellt. Die CuKα-Strahlung der verwendeten Röntgendrehanode liegt mit einer Wellenlänge von 1.5418 Å in der Nähe der L-II Absorptionskante von Gadolinium, die ihr Maximum bei 1.5634 Å aufweist. Bei dieser Wellenlänge werden noch theoretische anomale Streufaktoren von $f' = -9.2$ und $f'' = 12.0$ erreicht^[166].

Mit Hilfe dieser Messungen war es möglich per *SHELX_CDE*^[151] erste Phasen zu erhalten. Dabei wurden von *SHELXD* eine vollständig besetzte und

vier teilweise besetzte Gd³⁺-Bindungsstellen gefunden. Mit den Phasen des invertierten Schwermetallmodells aus *SHELXE* war es anschließend möglich, eine automatische Modellierung durch *ARP/wARP*^[159] durchzuführen, bei der 227 von 270 Resten in die

Elektronendichte modelliert werden konnten. Der weitere Modellbau wurde durch manuelle Manipulation mit *coot*^[160] und automatische Verfeinerung mit *refmac5*^[161] ausgeführt.

4.1.5 Atomare Struktur des Flo5A C-Typ-Lektins

Mit der experimentell phasierten Struktur war es möglich auch andere Flo5A Datensätze durch Molekularen Ersatz zu lösen. Die zugehörigen Statistiken sind in Anhang 7.1.1 und 8.1.2 aufgeführt. Datensätze mit einer atomaren Auflösung von bis zu 0.95 Å ermöglichten genaueste Einblicke in den Kohlenhydratbindungsmodus von Flo5A. Wie erwartet zeigt Flo5A als Hauptfaltungsmotiv eine β -Sandwich-Architektur, bestehend aus zwei β -Faltblättern, die strukturelle Ähnlichkeit mit der PA14-Domäne aufweist. Eine strukturelle Überlagerung mit PA14 aus *B. anthracis* (PDB code: 1ACC) ergab einen r.m.s.d von 1.4 Å bezogen auf 78 C $_{\alpha}$ -Atome der Kerndomäne. Diese Domäne wird durch zwei Disulfidbrücken stabilisiert, die den N-Terminus ebenso wie den C-Terminus mit zwei Cysteinen zwischen den β -Strängen 12 und 13 verbinden. Die so verknüpften Termini bilden zusammen mit den β -Strängen 1 und 19 eine L-förmige Region, die das Innere des β -Sandwiches vom Lösungsmittel abschirmt. Des Weiteren fällt eine Subdomäne auf, die zwischen den β -Strängen 4 und 10 eingefügt ist. Sie weist ebenfalls eine β -Sandwich-Architektur auf und wird nur in Flokkulinen aus *S. cerevisiae* gefunden (siehe 4.1.7), so dass sie Flo5-Subdomäne genannt wurde. Ebenso wie die PA14-ähnliche Domäne wird diese Subdomäne durch zwei Disulfidbrücken stabilisiert.

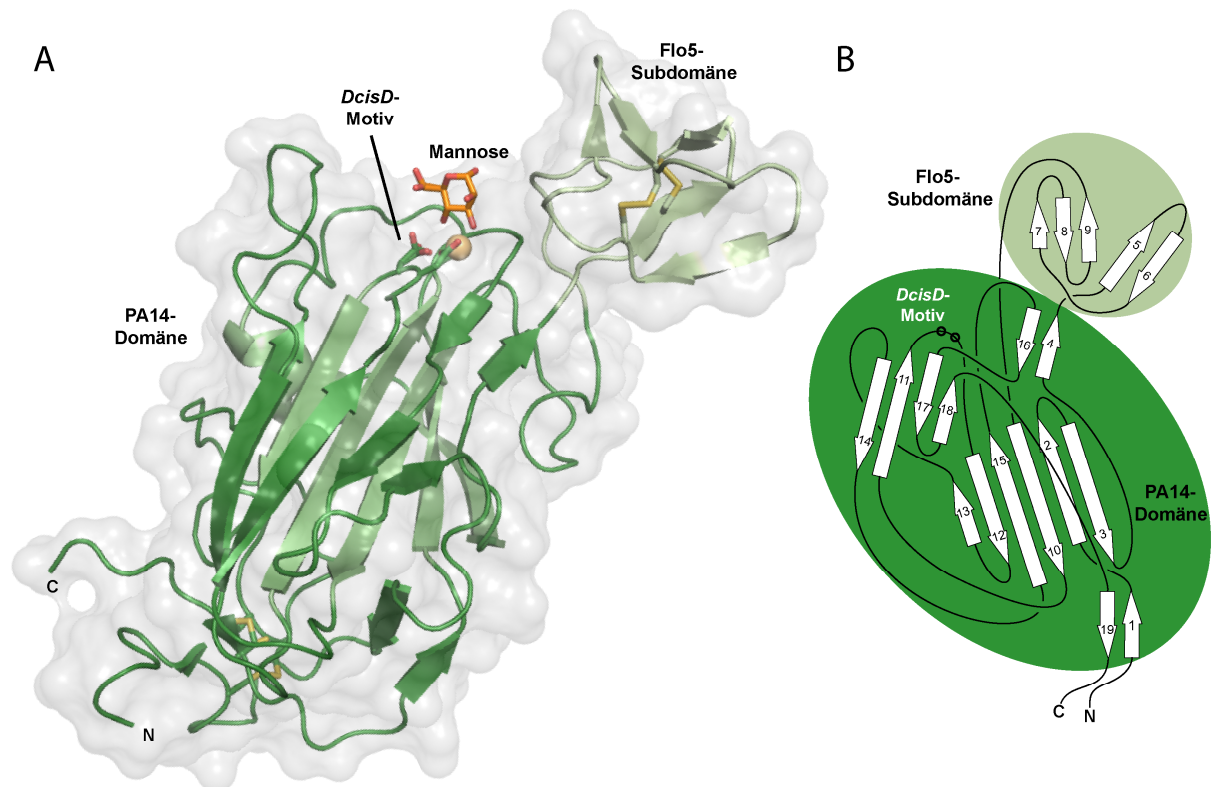


Abb.4.5: **A** Atomare Struktur von Flo5A. Die PA14-Domäne in Dunkelgrün wird durch die für Flo5A-typische Flo5-Subdomäne in hellgrün ergänzt. Das essentielle *DcisD*-Motiv ist in Stab-Darstellung hervorgehoben, das für die Bindung notwendige Calcium-Ion ist in gold dargestellt. In der Bindungstasche befindet sich ein Mannoserest. **B** eine schematische Darstellung der Flo5A-Topologie.

Die Kohlenhydratbindungsstelle weist ein außergewöhnliches Motiv auf, zwei über eine *cis*-Peptidbindung verbundene Aspartate (D160-D161), welches *DcisD*-Motiv genannt wurde. Dieses *DcisD*-Motiv komplexiert sowohl das Calcium, welches direkt in der Kohlenhydratbindung involviert ist, als auch ein mögliches gebundenes Kohlenhydrat selbst. Weiterhin wird das Calcium von der Seitenkette des Asparagins 224 und den Rückgrat-Carbonylen der Aminosäuren Valin 226 und Tryptophan 228 koordiniert (Abb. 4.6).

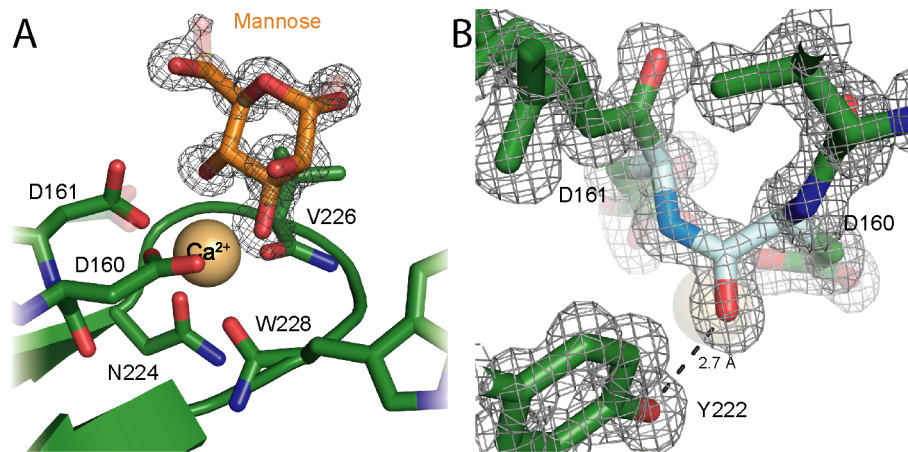


Abb.4.6: **A** Bindungsmodus des Calciums und der Mannose in der Substratbindungstasche. Die Calcium koordinierenden Reste sind in Stab-Darstellung gezeigt. Der Konturierungsgrad der Elektronendichte liegt bei 1σ . **B** Die Hydroxylgruppe von Tyrosin 222 koordiniert das Rückgrat-Carbonyl des *DcisD*-Motivs, der Konturierungsgrad der Elektronendichte liegt bei 1.5σ . Das Modell ist in der Proteindatenbank (wwPDB) unter 2XJP deponiert, die Datensammlungs- und Verfeinerungsstatistiken befinden sich im Anhang 7.1.2.

Das Rückgrat-Carbonyl des ungewöhnlichen *DcisD*-Motivs wird durch die Hydroxylgruppe der Tyrosinseitenkette 222 koordiniert. Möglicherweise wird dadurch, gemeinsam mit der Ca^{2+} -Bindung, die sterisch gehinderte *cis*-Peptidbindung stabilisiert.

4.1.6 Sekundäre Kohlenhydrat-Bindungstasche

Bei einer hohen Mannosekonzentration von 2 M, die gleichzeitig als *Cryo*-Protektant funktionierte, konnte eine weitere Kohlenhydratbindungsstelle gefunden werden. Diese befindet sich in einer sauren Spalte des Proteins (Abb. 4.7). Das gebundene Kohlenhydrat interagiert hauptsächlich mit Rückgrat-Atomen aus den Schleifen $\beta 3$ - $\beta 4$ und $\beta 9$ - $\beta 10$ sowie mit einem Netzwerk aus Lösungsmittelmolekülen, das von Aspartat 78, Aspartat 125, Glutamin 76 und einigen Rückgrat-Carbonylen und -Stickstoffen aufgespannt wird. Auch bei hohen molaren Glucosekonzentrationen konnte eine Glucosebindung in der sekundären Bindungsstelle festgestellt werden, die stärker war als in der primären Bindungsstelle (100% zu 90%)

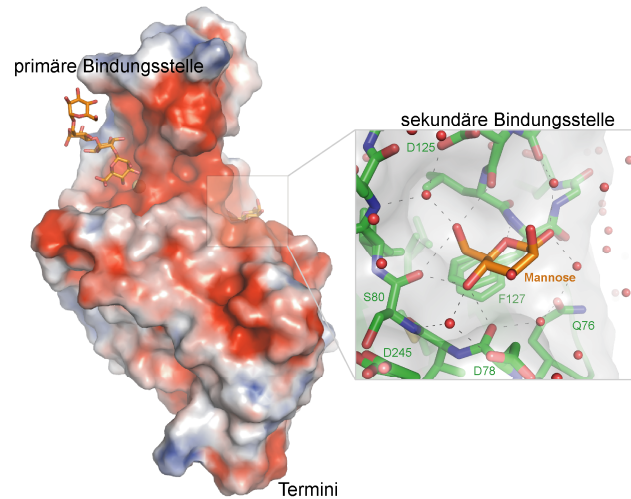


Abb.4.7: Elektrostatistische Oberfläche von Flo5A, berechnet mit APBS^[164]. Die Ladungswerte erstrecken sich von rot: -5 kT/e zu blau: +5 kT/e. In der Vergrößerung ist die sekundäre Kohlenhydratbindungsstelle zu sehen, die sich in einer sauren Spalte von Flo5A befindet.

4.1.7 Vergleich von Flo5A mit anderen PA14-Domänen-haltigen Proteinen

Um Vergleiche mit anderen PA14-Domänen enthaltenden Proteinen zu ermöglichen, wurde ein multiples Alignment mit Proteinen aus verschiedenen Eu- und Prokaryoten durchgeführt. Verwendet wurden die zu Flo5 nahe verwandten Flokkuline Flo1A (UniProt-ID: P32768) und LgFlo1A (B3IUA8) aus *S. cerevisiae*, beziehungsweise *S. pastorianus*, das epitheliale Adhäsion Epa1A (Q6VBJ0) aus der pathogenen Hefe *C. glabrata*, eine putative α -1,2-Mannosidase (Q8A3K6) aus dem gramnegativen menschlichen Kommensalen *Bacteroides thetaiotaomicron*, eine putative humane Acetylgalactosaminyltransferase (Q8N9V0) und die PA14-Domäne aus dem protektiven Antigen des *B. anthracis* Toxins (P13423). Das Ergebnis des strukturellen Alignments ist in Abbildung 4.8 zu sehen.

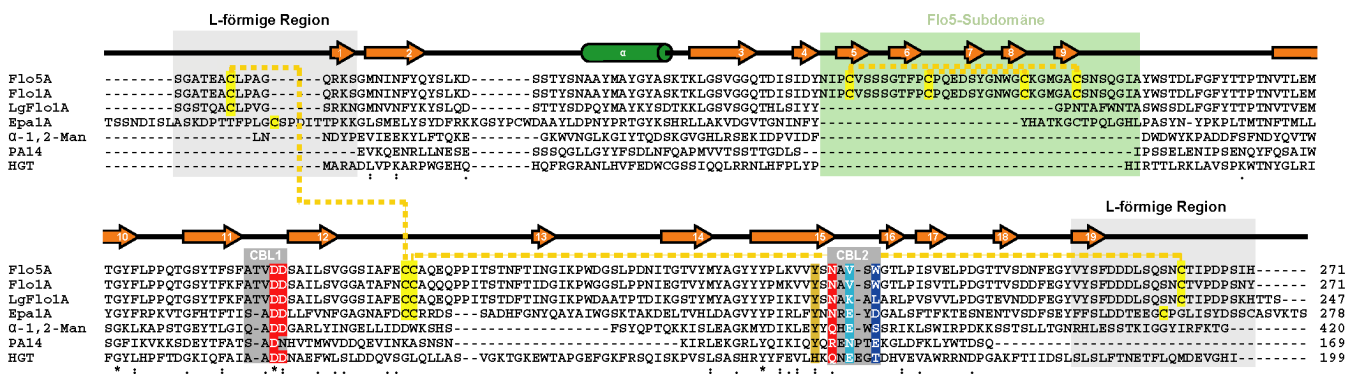


Abb.4.8: Strukturelles Alignment von Flo5A mit den Flokkulinen Flo1A und LgFlo1A, dem Adhäsion Epa1A aus *C. glabrata*, einer bakteriellen α -1,2-Mannosidase, der PA14-Domäne aus *B. anthracis* und einer Domäne einer humanen Acetylgalactosaminyltransferase.

Im Alignment ist zu sehen, dass die Flo5-Subdomäne ausschließlich in Flo1A und Flo5A vorkommt, schon LgFlo1A aus der Brauhefe *S. pastorianus* weist keine Flo5-Subdomäne auf. Dies deutet auf eine Funktion der Subdomäne in der Substraterkennung hin, da die LgFlo1A-vermittelte Flokkulation nicht nur durch Mannoside, sondern auch durch Glucose zu inhibieren ist^[44]. Die Disulfidbrücken zwischen N- und C-Termini und zwei sequentiellen Cysteinen (C175-C176) sind in den Vertretern der pilzlichen PA14-Domänen konserviert, wenn auch bei Epa1A leicht verschoben. Das bakterielle und das humane Beispiel weisen keine Disulfidbrücken zur Stabilisierung auf, was auf das cytosolische und damit reduzierende Milieu zurückzuführen ist, in dem diese Proteine vorliegen. Die L-förmige Region zur Abschirmung des β -Sandwiches gegen Lösungsmittelmoleküle ist ebenfalls nur in den pilzlichen Proteinen zu sehen. Die für die Substratbindung notwendigen Reste dagegen sind sowohl in den Adhäsinen als auch in der bakteriellen Mannosidase und der humanen Acetylgalactosyltransferase gut konserviert. Das in CBL1 (*calcium binding loop 1*) lokalisierte *DcisD*-Motiv, welches essentiell für die Calciumbindung ist, erscheint in allen untersuchten Proteinen konserviert, abgesehen vom protektiven Antigen aus *B. anthracis*. Es ist bekannt, dass dieses Protein über keine Kohlenhydratbindungskapazität verfügt, so dass auch keine funktionale Calciumbindungsstelle notwendig ist. CBL 2 (*calcium binding loop 2*) enthält das für die Calciumbindung in Flo5A notwendige Asparagin 224 (rot dargestellt). Dieses ist in den pilzlichen Adhäsinen konserviert, in der Mannosidase und der Acetylgalactosyltransferase durch ein Glutamin ausgetauscht, welches eine ähnliche Funktionalität zur Verfügung stellt. Das in der PA14-Domäne an dieser Stelle vorhandene Arginin ist mit einer möglichen Calciumbindung aufgrund seiner positiven Ladung nicht zu vereinbaren. Die in hellblau und dunkelblau dargestellten Reste koordinieren das Calcium mit ihren Rückgrat-Carbonylen, so dass die Seitenkette keinen Einfluss auf die Bindung hat und somit auch keine Konservierung zeigt. Ein Einfluss auf die Kohlenhydratspezifität ist dennoch möglich. Das in ockergelb dargestellte, kurz vor CBL2 gelegene Tyrosin 222 scheint ebenfalls durchgängig konserviert, beziehungsweise durch ein Histidin ersetzt zu sein, welches die *cis*-Peptid stabilisierende Funktion der Tyrosin-Hydroxylgruppe übernehmen könnte.

4.1.8 Die trigonale Kristallform von Flo5A

Tab.4.4: Kristallform II

Datensatz	MV210
Datum	07.05.2009
Röntgenquelle	ESRF ID14-2
Wellenlänge (Å)	0.933
Detektor	ADSC Q4
Temperatur (K)	100
Raumgruppe	P ₃ ₂ 12
Zellmaße (Å)	
a	41.2
b	41.2
c	262.5
α, β, γ	90°, 90°, 120°
Moleküle / a.s.u.	1
Auflösung (Å)	19.83 – 2.00 (2.11 – 2.00)
beobachtete Reflexe	79638
einzigartige Reflexe	17789
Vollständigkeit (%)	99.6 (99.0)
Multiplizität	4.5 (4.5)
Mittleres I/σ(I)	17.0 (2.9)
R _{merge} (%)	8.3 (66.9)
Auflösung	19.83 – 2.0
R _{work} (%)	23.41
R _{free} (%)	26.96
Reflektionen work	16877
test	910
mittlerer B _{wert} (Å ²)	26.87
r.m.s.d. Bdglänge (Å)	0.012
Bdgswinkel. (°)	1.40

Wenn verschiedene Kristallformen eines Proteins vorliegen, ermöglicht dies die Identifizierung möglicher Änderungen der Proteinkonformation durch Effekte der Kristallpackung. Dadurch wird die Zuverlässigkeit eines Röntgenstrukturmodells erhöht.

Durch molekularen Ersatz mit der zuvor erhaltenen Flo5A Struktur in Kristallform I war es möglich, Röntgenstrukturen der Kristallform II zu lösen. Diese Kristallform zeigte die trigonale Raumgruppe P₃₂12, in Verbindung mit einer langen Zellachse von 262.5 Å. Die erhaltene Struktur von Flo5A unterschied sich mit einem r.m.s.d von 0.18 Å bei 160 verglichenen C_α Atomen praktisch nicht von der in Kristallform I beobachteten Struktur. Da die Kristallpackung aber keine Bindung größerer Kohlenhydrate zuließ und die erhaltene Kristallqualität nur Auflösungen von bis zu 2 Å ermöglichten, wurden keine weiteren Versuche an dieser Kristallform durchgeführt.

4.2 Untersuchung der Bindungsspezifität von Flo5A

Zu Beginn dieser Arbeit war nicht bekannt, welche Kohlenhydrate von Flo5A gebunden werden, daher wurden verschiedene Ansätze verfolgt, um Spezifität und Affinität verschiedener Kohlenhydrate zu eruieren. Hierzu wurden verschiedene auf der Zelloberfläche von *S. cerevisiae* vorhandene Kohlenhydrate untersucht. Es wurden zwei verschiedene Pentamannoside aus der komplexen Hochmannose-N-Glycosylierung, ein Tri-Mannosid, das sowohl in der N- als auch in der O-Glycosylierung vorkommt sowie drei verschiedene Dimannoside untersucht. Eine Zusammenstellung der verwendeten Verbindungen ist in Abbildung 4.9 zu sehen.

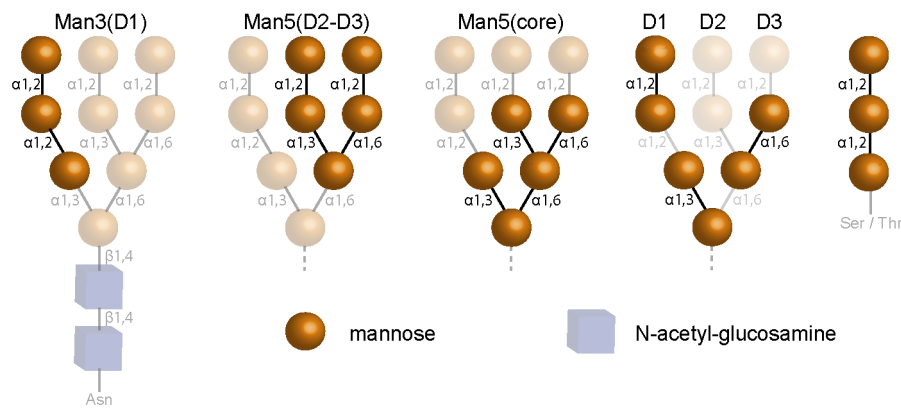


Abb.4.9 N- und O-Glycosylierung auf der *S. cerevisiae*-Zelloberfläche. Die untersuchten Mannoside sind massiv gezeichnet, sie sind jeweils eine Teilmenge einer vollständigen N- oder O- Glycosylierung.

4.2.1 Glykan-Bindung durch die Flo5A-Domäne

Zuvor bereits gebildete orthorhombische Flo5A-Kristalle wurden in ihrer Mutterlauge, die mit 100 mM CaCl_2 und 50 mM des jeweiligen Zuckers supplementiert war, für 24 h im Dampfdiffusions-Gleichgewicht mit ihrer Mutterlauge *gesoakt*. Anschließend wurden die Kristalle in der *soaking*-Lösung, die mit 15% Glycerin versetzt wurde, in flüssigem Stickstoff eingefroren.

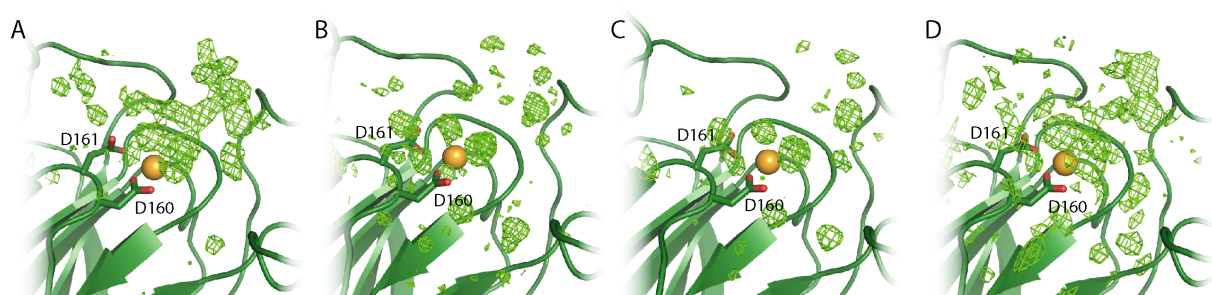


Abb.4.10: **A:** Flo5A gesoakt mit 50 mM α -1,2-Mannobiose, Die Disaccharid-Differenzelektronendichte (SigmaA-gewichtete F_0-F_c) ist deutlich zu erkennen. **B:** Flo5A gesoakt mit 50 mM α -1,3-Mannobiose, **C:** Flo5A gesoakt mit 50 mM α -1,6-Mannobiose, nur Differenzelektronendichte für Wasser ist zu erkennen. Der Konturierungsgrad der Differenzelektronendichte liegt bei 3 σ . **D:** Flo5A gesoakt mit je 16.6 mM der drei in A-C verwendeten Disaccharide, der Konturierungsgrad der Differenzelektronendichte liegt bei 2.2 σ . Die Datensammlungs- und Verfeinerungsstatistiken zu diesen Modellen befinden sich in Anhang 7.1.1.

In Abbildung 4.10 ist zu sehen, dass ausschließlich α -1,2-Mannobiose in der Substratbindungstasche von Flo5A gebunden wird. Auch ein kompetitives *Soaking* mit jeweils 16.6 mM der α -1,2-, α -1,3- und α -1,6-Mannobiosen zeigte, wenn auch weniger definiert, Differenzelektronendichte für α -1,2-Mannobiose (Abb. 4.10 D). Ein weiteres Indiz für diese Schlussfolgerung ist die Rotation der Seitenkette des Aspartats 161 um circa 70 ° bei Bindung eines Kohlenhydrats aufgrund der Koordination dessen 4-Hydroxylgruppe

(Abb.4.6 A). Diese tritt in Abb. 4.10 A und D auf, aber nicht bei *Soakings* mit α -1,3- oder α -1,6-Mannobiose (Abb. 4.10, C und D).

Nach weiterer Verfeinerung konnte der Bindungsmodus der α -1,2-Mannobiose genau bestimmt werden (Abb. 4.11, A). Der primäre Mannoserest wird dabei vom Calciumion und von den Aminosäureseitenketten D160, D161, S227 und Q98 koordiniert, der sekundäre Mannoserest von den Aminosäureseitenketten S227 und Q117. Q98 und Q117 liegen in der Flo5-Subdomäne und sind vermutlich für die Kohlenhydratspezifität von Flo5A entscheidend.

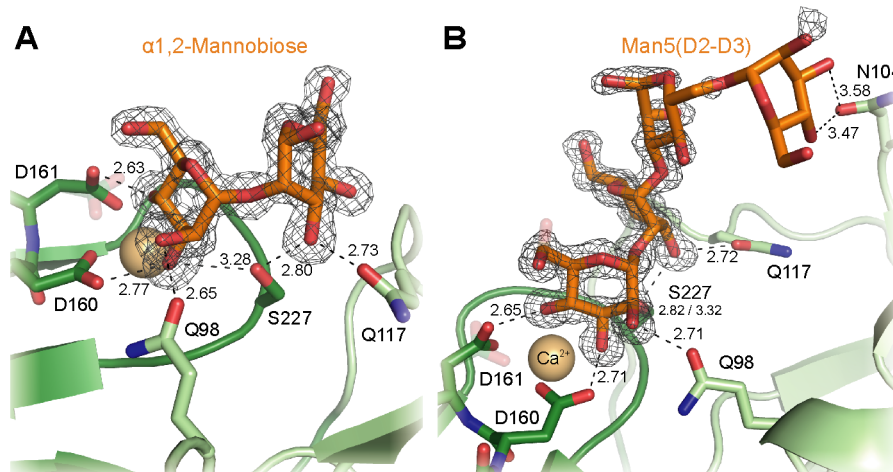


Abb.4.11: **A:** α -1,2-Mannobiose in der Flo5A-Bindungstasche, beide Mannosereste sind gut definiert (PDB: 2XJS). **B:** Man5(D2-D3) in der Flo5 Bindungstasche, nur der vordere, einer α -1,2-Mannobioseseinheit entsprechende Teil der Mannopentaose ist gut definiert, der tertiäre und der quartäre Mannoserest sind deutlich variabler. (PDB: 2XJR) Die Kohlenhydrat koordinierenden Reste sind in Stab-Darstellung gezeigt, die Elektronendichte ist bei 1.5 σ konturiert, die Abstände sind in Ångström angegeben. Die Datensammlungs- und Verfeinerungsstatistiken zu diesen Modellen befinden sich in Anhang 7.1.2.

Weitere *soakings* wurden mit zwei verschiedenen Pentamannosiden und einem α -1,2- α -1,2-Trimannosid (Man3(D1)) durchgeführt. Während für das Core-Pentamannosid Man5(core) keine zusätzliche Differenzelektronendichte gefunden werden konnte, ließen sich die beiden terminalen α -1,2-verknüpften Mannosereste des Pentamannosids Man5(D2-D3) gut modellieren (Abb.4.11, B). Der dritte und insbesondere der vierte Mannoserest, sind strukturell stärker variabel, was sich durch erhöhte B-Faktoren und schlechter definierte Elektronendichte ausdrückt. Für den fünften Mannoserest von Man5(D2-D3) konnte keine Elektronendichte gefunden werden. Zusammen mit dem Ergebnis des *Soakings* mit Man3(D1), bei dem interpretierbare Elektronendichte nur für zwei terminale Mannosereste vorhanden war, ergibt sich eine Flo5A-Spezifität für terminale α -1,2-verknüpfte Mannoside, die offenbar daraus abgeleitete, größere Oligosaccharide toleriert.

4.2.2 Quantifizierung der Flo5A-Glykan Wechselwirkungen

Um Bindungskonstanten für verschiedene Mannoside zu bestimmen, wurden Fluoreszenztitrationen an Flo5A durchgeführt. Flo5A enthält vier Tryptophane (W105, W122, W196 und W228), die als intrinsischer Fluorophor bei einer Wellenlänge von 295 nm angeregt werden können, zwei davon (W105 und W228) in der Nähe der Bindungstasche. Das Emissionsmaximum wurde im Bereich von 342-345 nm beobachtet, während Ligand hinzutitriert wurde. Die aus dem Energieübertrag auf den gebundenen Liganden resultierende Fluoreszenzauslöschung konnte gegen die Konzentration des Liganden aufgetragen werden, so dass daraus Bindungskonstanten ermittelt werden konnten.

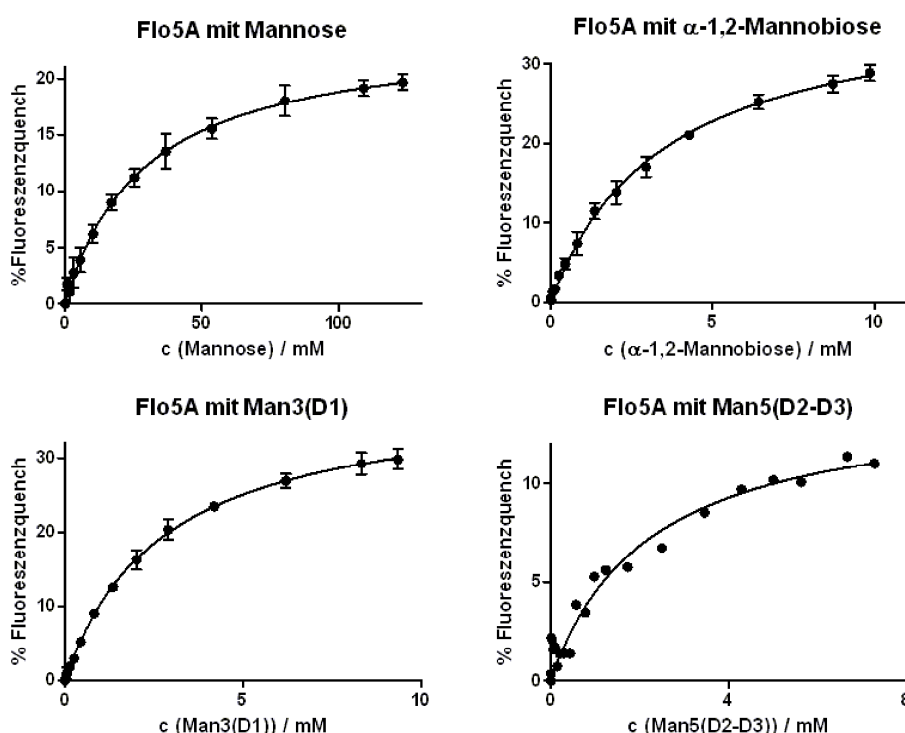


Abb.4.12: Fluoreszenzmessungen an Flo5A mit verschiedenen Substraten. Durch fitten mit dem Programm Prism5 (GraphPad Software) konnten Bindungskonstanten für die einzelnen Liganden ermittelt werden.

Tab.4.5: Bindungskonstanten Flo5A

Ligand	K_D / mM
Mannose	29.3 ± 3.6
α-1,2-Mannobiose	3.5 ± 0.3
Man3(D1)	2.8 ± 0.2
Man5(D2-D3)	2.2 ± 0.5

In Abbildung 4.12 sind Fluoreszenztitrationen von Flo5A mit verschiedenen Substraten zu sehen. Die Messreihen mit Mannose, α-1,2-Mannobiose und Man3(D1) wurden dreifach reproduziert und das arithmetische Mittel mit dem zugehörigen Standardfehler aufgetragen. Aufgrund zu geringer vorhandener Substanzmenge, konnte bei dem Liganden Man5(D2-D3) nur eine Messreihe aufgenommen werden. Der ermittelte Wert für die Bindungskonstante liegt aber in

der Größenordnung der Bindungskonstante für α -1,2-Mannobiose, was sich mit den Beobachtungen der Kristall-*Soaking*-Experimente deckt.

4.3 Analyse von Mutanten des Flo5A-Lektins

Basierend auf der Struktur von Flo5A wurden verschiedene Mutanten durch Punktmutation hergestellt. Die hierbei mutierten Aminosäuren waren entweder direkt in die Bindung des Calciumions oder des Kohlenhydrats involviert, hatten eine strukturelle Funktion oder waren bereits zuvor als entscheidend für die Spezifität der *S. cerevisiae* Flokkuline beschrieben worden. Eine Übersicht ist in Tabelle 4.6 gegeben.

Tab.4.6: Übersicht der Flo5A-Mutanten

Mutante	Ausbeute	erwarteter Effekt	beobachteter Effekt
Wildtyp	22.5 mg/L	/	/
D160A/D161A	unlöslich	Verhinderung der Calcium- und Kohlenhydratbindung	keine native Faltung möglich
N224A	1.2 mg/L	Schwächung der Calcium- und Kohlenhydratbindung	keine native Faltung möglich
Y222F	10 mg/L	Destabilisierung des <i>DcisD</i> -Motivs	kein Einfluss auf die Stabilität des Proteins
S227A	25 mg/L	veränderte, möglicherweise geschwächte Ligandbindung	veränderte, aber gestärkte Ligandbindung
Q98A	7 mg/mL	erhöhte Promiskuität gegenüber Glucosebindung	leicht erhöhte Promiskuität in der Glucosebindung, anderer Bindungsmodus als für Mannose wird beobachtet
D202T	10 mg/mL	erhöhte Promiskuität gegenüber Glucosebindung	gestärkte Ligandbindung, variabler <i>loop</i> β 13- β 14 liegt in anderer Vorzugskonformation vor

4.3.1 D160A/D161A

Diese Variante zerstört das essentielle *DcisD*-Motiv, welches zur Calcium- und zur Kohlenhydratbindung notwendig ist. Es wurde erwartet, dass keine Bindungsaktivität mehr nachgewiesen werden kann oder diese zumindest stark geschwächt ist.

Bereits während der rekombinanten Überproduktion von D160A/D161A wurde deutlich, dass das Ersetzen des *DcisD*-Motivs einen derart radikalen Eingriff in die Struktur von Flo5A darstellt, dass das Protein mit den erprobten Verfahren nicht löslich hergestellt werden konnte. Auf weitere Untersuchungen an dieser Variante wurde verzichtet.

4.3.2 N224A

Die Variante N224A betrifft ebenfalls die Calciumbindung. Der Rest, der sich in der Calcium bindenden Schleife 2 (CBL2) befindet, koordiniert mit dem Sauerstoffatom seiner

Amidgruppe das Calciumion, ergänzend zu den Rückgrat-Carbonylen von Valin 226 und Tryptophan 228. Durch die Mutation zu Alanin wurde erwartet, dass die Calciumbindung gestört wird und dadurch eine schlechtere oder gar keine Kohlenhydratbindung mehr zu beobachten ist.

Während der rekombinanten Überproduktion wurde deutlich, dass nur geringe Mengen der Variante Flo5A-N224A löslich produziert werden konnten. Diese ließen sich zudem nur unzureichend reinigen und zeigten in CD-spektroskopischen Untersuchungen, als auch bei Kristallisationsversuchen das Verhalten von ungefaltetem Protein. Auf weitere Untersuchungen dieser Variante *in vitro* wurde verzichtet.

4.3.3 Y222F

Wie in Abbildung 4.13 und im multiplen Sequenzvergleich (Abb.4.8) zu sehen ist, scheint das Tyrosin an Stelle 222 in Flo5A für die Stabilisierung der *cis*-Konformation des *DcisD*-Motivs notwendig zu sein. Die Hydroxylgruppe dieses Aminosäurerests koordiniert das Rückgrat-Carbonyl der *cis*-Peptidbindung, daher wurde durch den Austausch des Tyrosins in ein Phenylalanin erwartet, dass das *DcisD*-Motiv nicht mehr auftritt oder zumindest destabilisiert wird.

Die Kristallisation von Flo5-Y222F verlief analog zu Flo5A, die Struktur konnte durch molekularen Ersatz gelöst werden.

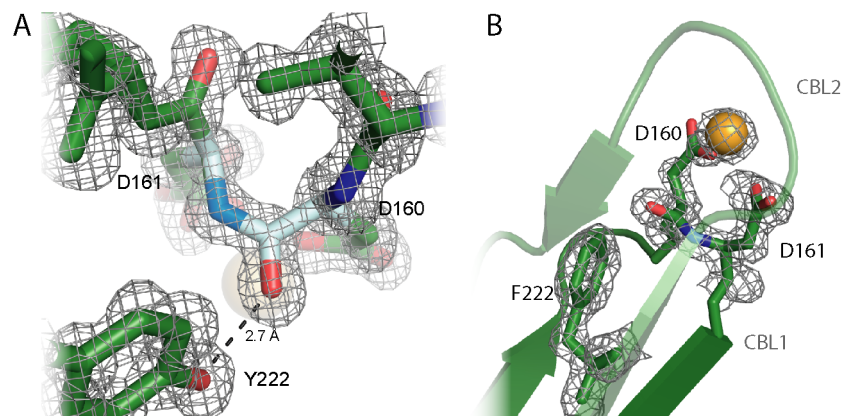


Abb.4.13: **A:** Darstellung des *DcisD*-Motivs mit dem im Wildtyp vorhandenen Tyrosin, entsprechend Abbildung 4.6. **B:** Trotz der erfolgten Mutation von Y222 nach F222 und damit der Aufhebung der stabilisierenden Interaktion, liegt das *DcisD*-Motiv unverändert vor. Die Elektronendichte ist jeweils bei 1.5 σ konturiert, die Datensammlungs- und Verfeinerungsstatistiken zu B befinden sich in Anhang 7.1.3.

In der Struktur der Variante lässt sich kein Hinweis auf eine Destabilisierung durch die Mutation von Y222 nach F222 finden. Auch in der Kohlenhydratbindung ist die Variante Flo5A-Y222F nicht beeinträchtigt (Struktur nicht gezeigt).

Um eine mögliche strukturelle Destabilisierung der Variante Flo5A-Y222F nachzuweisen, wurden CD-Spektren der Variante mit CD-Spektren von Flo5A verglichen. Ebenso wurden Schmelzkurven dieser beiden Proteine gegenübergestellt.

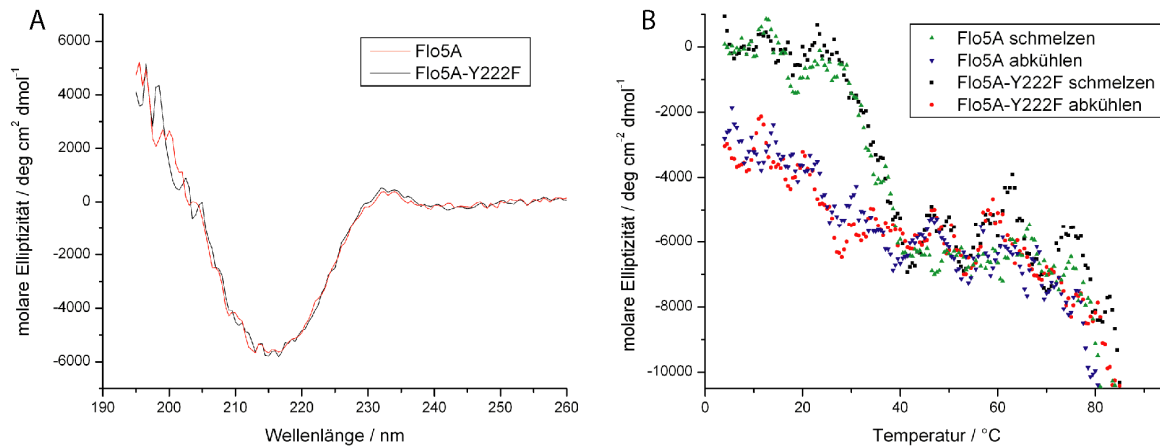


Abb.4.14: **A:** CD-Spektrum von Flo5A und Flo5A-Y222F im Vergleich. Es ist offenbar kein Unterschied in der Sekundärstruktur auszumachen: **B:** Vergleich der thermischen Denaturierung von Flo5A und Flo5A-Y222F. Auch hier lässt sich kein Unterschied in der Schmelztemperatur ausmachen

Die CD-Spektroskopie liefert keinen Hinweis darauf, dass die Variante Flo5A-Y222F instabiler sein könnte als Flo5A. Sowohl das CD-Spektrum (Abb. 4.14, A) der beiden Flokkuline als auch die thermische Denaturierung (Abb. 4.14, B) weist keinen signifikanten Unterschied auf. Der Schmelzpunkt beider Proteine liegt bei etwa 32 °C. Aus diesen Ergebnissen lässt sich folgern, dass Y222 zumindest in Flo5A keine stabilisierende Wirkung auf das *DcisD*-Motiv hat.

4.3.4 S227A

In Flo5A koordiniert die Aminosäure Serin 227 die 3-Hydroxylgruppen der primären als auch der sekundären Mannose einer gebundenen α -1,2-Mannobiose. Eine Mutation dieser Aminosäure sollte zu einer Beeinflussung der Kohlenhydratbindung in Flo5A führen. Da Interaktionen mit dem Protein verringert werden, wurde eine abgeschwächte Bindung von Mannose und α -1,2-Mannobiose erwartet.

Die Struktur von Flo5A-S227A konnte durch molekularen Ersatz gelöst werden. Die Struktur ist in der PDB unter der Zugriffsnummer 2XJU abgelegt. Die Datensammlungs- und Verfeinerungsstatistiken finden sich in Anhang 7.1.3.

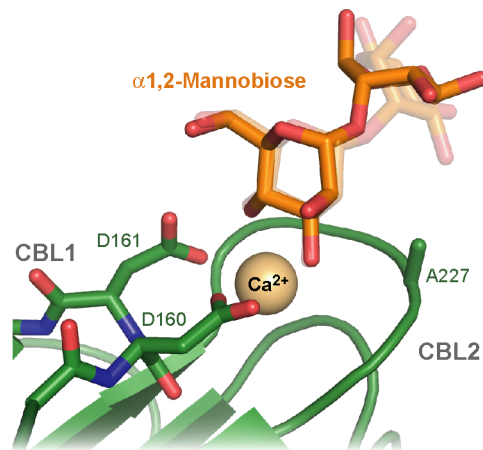


Abb.4.15: Struktur von Flo5-S227A mit gebundener α -1,2-Mannobiose. Die transparente Stab-Darstellung zeigt die Konformation von α -1,2-Mannobiose in Flo5A. Es ist zu sehen, dass die sekundäre Mannoseeinheit in Flo5A-S227A verkippt ist.

In der Struktur von Flo5A-S227A in Komplex mit α -1,2-Mannobiose ist zu sehen, dass das Kohlenhydrat einen anderen Bindungsmodus einnimmt. Da die Interaktion der 3-Hydroxylgruppe des Mannosids mit der des Serins 227 verloren gegangen ist, kann sich die sekundäre Mannoseeinheit so orientieren, dass sowohl ihre 2- als auch ihre 3-Hydroxylgruppe eine Interaktion mit der Aminosäure Q117 aus der Flo5-Subdomäne eingehen können.

Um zu überprüfen, inwiefern sich die Mutation von Serin 227 zu Alanin auf die Bindungsstärke der Substrate auswirkt, wurden analog zu Flo5A Titrationsexperimente mit Mannose und α -1,2-Mannobiose durchgeführt und das Quenchen der intrinsischen Fluoreszenz beobachtet.

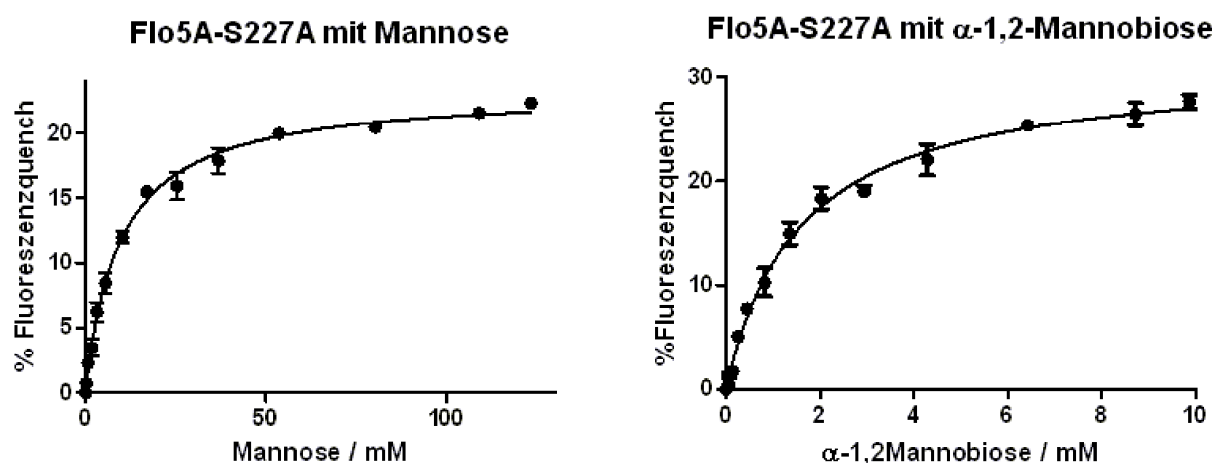


Abb.4.16: Fluoreszenzmessungen an Flo5A-S227A mit Mannose und α -1,2-Mannobiose. Durch Fitten mit dem Programm Prism5 (GraphPad Software) konnten Bindungskonstanten ermittelt werden.

Tab.4.7: Bindungskonstanten Flo5A-S227A

Ligand	K_D / mM
Mannose	9.7 ± 0.6
α -1,2-Mannobiose	1.6 ± 0.1

In Abbildung 4.16 sind Fluoreszenztitrationen von Flo5A-S227A mit verschiedenen Substraten zu sehen. Die Messreihen wurden dreifach reproduziert und das arithmetische Mittel mit dem zugehörigen Standardfehler aufgetragen. Die in Tabelle 4.7 gezeigten Bindungskonstanten sind überraschenderweise stärker als bei Flo5A. So erhöht sich die Bindungsstärke für α -1,2-Mannobiose um den Faktor 2 und die Bindungsstärke für Mannose sogar um den Faktor 3.

4.3.5 Q98A

Die Variante Flo5A-Q98A wurde gewählt, da die Seitenkette des Glutamins den 2-Hydroxylrest der primären Mannose in der Bindungstasche koordiniert. In der Mannose ist die Stellung dieses Restes axial, in Glucose wäre sie äquatorial und somit inkompatibel mit der Bindung in Flo5A. Daher wurde vermutet, dass der Rest Q98 zur Diskriminierung zwischen Mannose und Glucose dient und durch eine Mutation möglicherweise ein *NewFlo*-Phänotyp hervorgerufen werden könnte.

Die Struktur der Flo5A-Q98A Mutante konnte über molekularen Ersatz gelöst werden. Zwei Komplexstrukturen, sowohl mit Mannose als auch mit Glucose zeigten relativ schlecht definierte Elektronendichte, für die gebundenen Kohlenhydrate (Abb. 4.17).

Es wird deutlich, dass die Mannose in Flo5A-Q98A schlechter koordiniert wird, als in Flo5A. Dies drückt sich durch den schwach definierten Bereich zwischen C5, O5 und C1 aus. Durch die teilweise Rotation der Seitenkette von D161 wird allerdings deutlich, dass Mannose in dem üblichen Modus gebunden wird. Bei der Komplexstruktur mit Glucose tritt eine solche Rotation nicht auf, allerdings wird auch ein anderer Bindungsmodus gefunden. Während bei Mannose das Diol, welches aus der 3- und 4-Hydroxylgruppe gebildet wird, das Calciumion koordiniert, ist dies bei der Glucose die 2- und 3-Hydroxylgruppe.

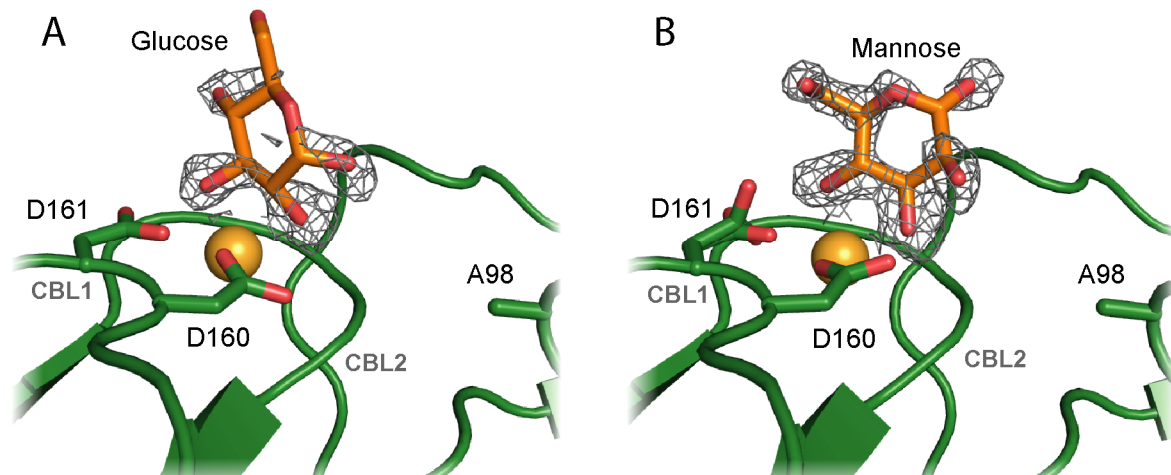


Abb.4.17: **A:** Flo5A-Q98A in Komplex mit Calcium und Glucose, **B:** Flo5A-Q98A in Komplex mit Calcium und Mannose, D161 liegt in zwei Konformationen mit je 50% Besetzung vor. Die Elektronendichten sind bei 0.8 σ konturiert.

4.3.6 D202T

Diese Variante wurde bereits 1998 von Kobayashi et al.^[44] für den *NewFlo*-Phänotyp verantwortlich gemacht, also eine Flokkulation, die nicht nur durch Mannose, sondern auch durch Glucose zu inhibieren ist. Obwohl die Flo5A-Struktur gezeigt hat, dass D202 circa 20 Å von der primären Kohlenhydratbindungsstelle entfernt liegt und somit keinen direkten Einfluss auf die Spezifität haben kann, wurde die Variante Flo5A-D202T erstellt.

In Abbildung 4.18 sind die Kristallstrukturen von Flo5A-D202T und Flo5A im Vergleich zu sehen. Der der Flo5A-D202T-Struktur zugrunde liegende Kristall wurde vor der Vermessung mit 2 M Glucose gesoakt, daher sind primäre und sekundäre Bindungsstelle mit diesem Kohlenhydrat besetzt.

Es ist zu sehen, dass die Glucose nicht der natürliche Ligand von Flo5A ist, da trotz der hohen verwendeten Konzentration das Kohlenhydrat in der primären Bindungstasche schwach definiert ist. Im Gegensatz zur Variante Q98A liegt die Glucose allerdings in dem selben Bindungsmodus vor, wie der native Ligand Mannose. Die Konformation von D161 liegt nur zu 30% im koordinierenden Zustand vor, Glutamin 98 ist aus der Bindungsstelle herausgeklappt und bindet ein benachbartes Natriumion. Die sekundäre Bindungsstelle weist eine ähnliche Besetzung auf (70%), wie aus hoch konzentrierten Mannose *soaks* bekannt.

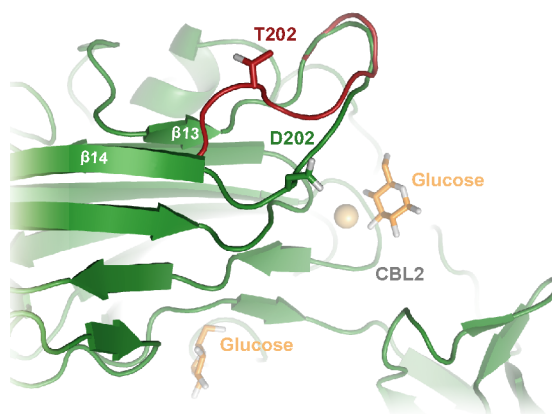


Abb.4.18: Komplexstruktur von Flo5A-D202T mit Glucose. Der rot dargestellte Teil des *loops* β 13- β 14 zeigt die Vorzugskonformation in der Variante Flo5A-D202T, während die grüne Darstellung die Vorzugskonformation des Wildtyps zeigt.

Es fällt allerdings auf, dass der flexible *loop* zwischen β 13- β 14 in der Variante Flo5A-D202T in einer anderen Vorzugskonformation vorliegt, als im Wildtyp. Eine mögliche Änderung in der Spezifität scheint also nur durch Veränderungen im Hydratnetzwerk an der Oberfläche des Flokkulins möglich.

Es wurde auch mit der Variante Flo5-D202T eine Fluoreszenztitration mit Mannose durchgeführt, um einen Vergleich der Substratbindungsstärke mit dem Wildtyp zu haben.

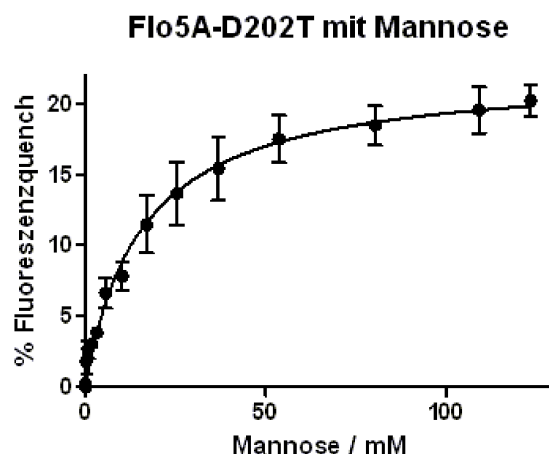


Abb.4.19: Fluoreszenzmessungen an Flo5A-D202T mit Mannose. Durch Fitten mit dem Programm Prism5 (GraphPad Software) konnte die Bindungskonstante ermittelt werden.

Tab.4.8: Bindungskonstanten Flo5A-D202T

Ligand	K_D / mM
Mannose	15.8 ± 2.6

In Abbildung 4.19 ist das Ergebnis der Fluoreszenztitration von Flo5A mit Mannose zu sehen. Die Messreihe wurde dreifach wiederholt und das arithmetische Mittel mit dem zugehörigen Standardfehler aufgetragen. Die in Tabelle 4.8 gezeigte Bindungskonstante ist um den Faktor 2 stärker als bei Flo5A. Dies kann nur durch die geänderte Vorzugskonformation des β 13- β 14-*loops* erklärt werden.

4.4 Gadolinium-Cluster auf der Flo5A-Oberfläche

Während der Experimente zur Phasierung von Flo5A durch *soaking* mit Gadoliniumacetat wurde eine interessante Beobachtung gemacht: Entgegen dem ausschließlich erwarteten Ersatz des Calciumions in der primären Kohlenhydratbindungsstelle durch ein Gadoliniumion, wurde ein Cluster aus bis zu sieben Gadoliniumionen in der sauren Spalte auf der Proteinoberfläche gefunden, die auch die sekundäre Kohlenhydratbindungsstelle enthält.

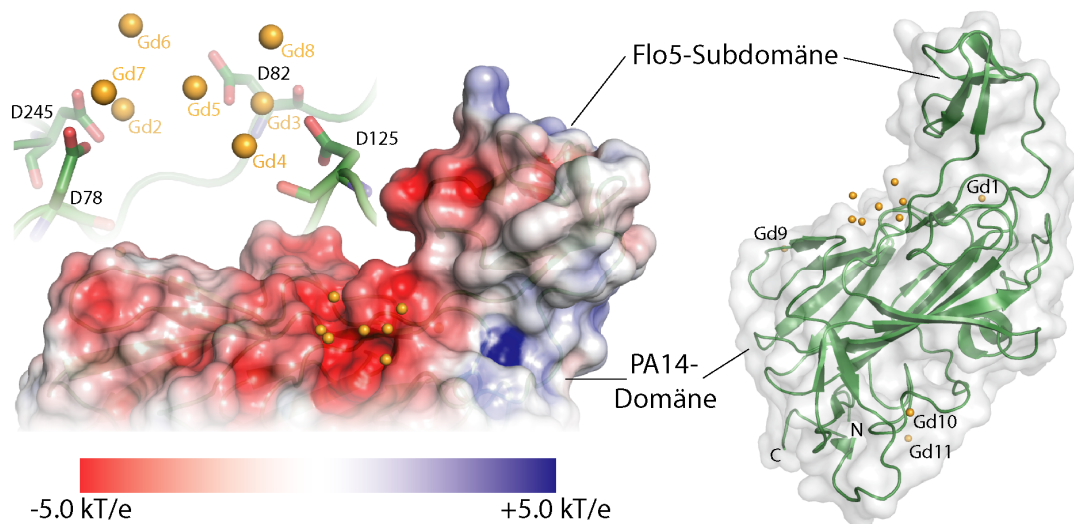


Abb.4.20: elektrostatische Oberfläche von Flo5A, berechnet mit APBS^[164]. Die Ladungswerte erstrecken sich von rot: -5 kT/e zu blau: +5 kT/e. In der sekundären Kohlenhydratbindungstasche ist ein heptanuklearer Gadolinium-Oxo-Cluster zu sehen (Gd2 – Gd8). Vier weitere Gadoliniumionen sind an sauren Resten auf der Proteinoberfläche (Gd9, Gd10 und Gd11) sowie an Stelle des Calciumions (Gd1) gebunden.

Wie in Abbildung 4.20 zu sehen ist, werden die Gadoliniumionen von den Aspartaten D78, D82, D125 und D245 koordiniert. Im nativen Zustand oder während sie ein Kohlenhydrat binden, befinden sich diese Reste in einer anderen Konformation und bilden erst die für die Cluster-Bildung notwendigen Rotamere aus, wenn Gadoliniumionen mit der Flo5A-Oberfläche interagieren. In einer hochauflösenden Struktur (1.5 Å, PDB-ID: 4AHW) konnten auch die verbrückenden Hydroxid- und Sauerstoffionen beobachtet werden (Abb. 4.21).

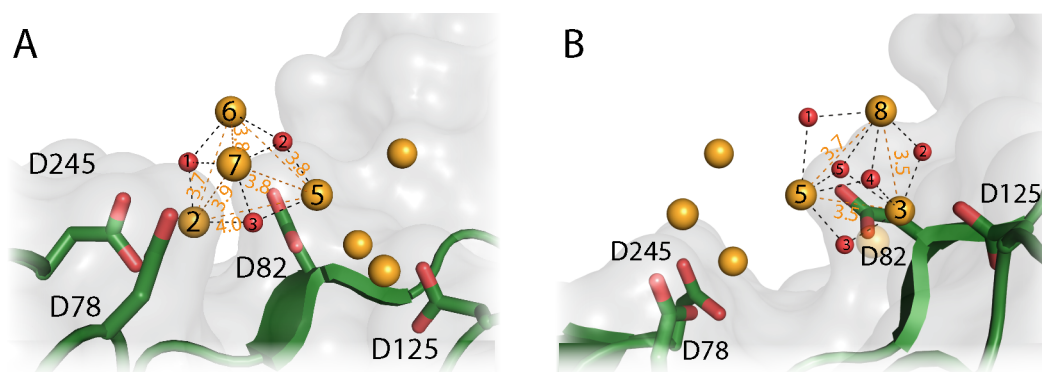


Abb.4.21: **A** Teilcluster aus Gd2, Gd5, Gd6, Gd7 und drei verbrückenden Oxo-Ionen. **B** Teilcluster aus Gd3, Gd5, Gd8 und fünf verbrückenden Oxo-Ionen. Die interatomaren Abstände sind in Ångström angegeben.

Um einen näheren Einblick in den Aufbau des Gadolinium-Oxo-Clusters zu erhalten, wurden *soakings* mit verschiedenen Inkubationszeiten in der gadoliniumhaltigen Lösung (Tab.4.9) durchgeführt. Die Datensammlungs- und Verfeinerungsstatistiken zu diesen Experimenten finden sich in Anhang 7.1.4.

Tab.4.9 Gd-Soaking-Puffer

BisTris Propan, pH7.5	100 mM
NaCl	500 mM
PEG4000	20%
GdAc ₃	50 mM

Wie in Abb. 4.22 zu sehen ist, wird der Gadolinium-Cluster sukzessive aufgebaut, während die weiteren auf der Flo5A-Oberfläche vorliegenden Gadoliniumionen schon nach der kürzesten Inkubationszeit maximal besetzt waren.

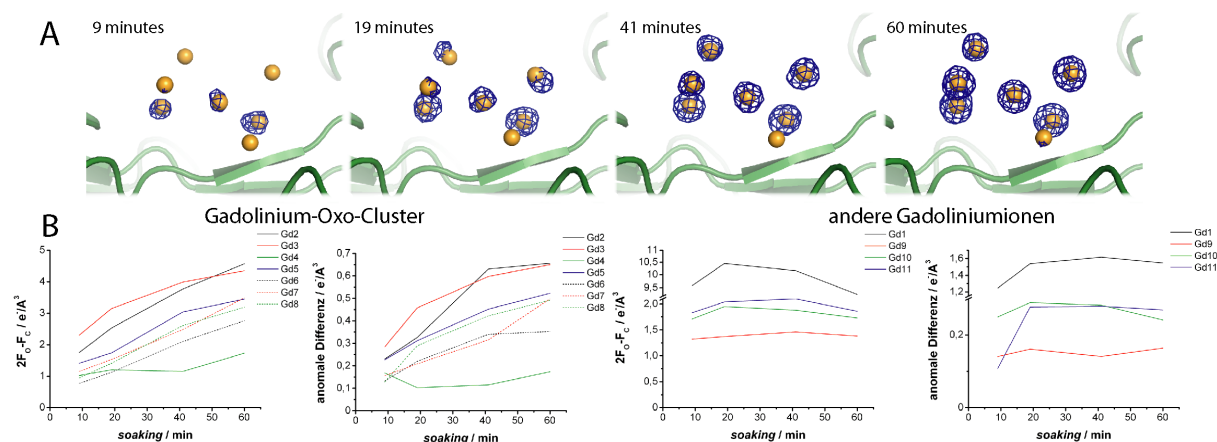


Abb.4.22: **A** der Gadolinium-Oxo-Cluster nach verschiedenen *soaking*-Zeiten. Die angezeigte anomale Dichte wurde bei 5 σ konturiert. **B** die Besetzung der Gadoliniumionen nach verschiedenen *soaking*-Zeiten, bestimmt sowohl in der SigmaA-gewichteten $2F_{\text{obs}} - F_{\text{calc}}$ -Elektronendichtekarte als auch in der anomalen Differenzdichtekarte, angegeben in Elektronen pro Kubik-Ångström.

Es ist zu sehen, dass die Position Gd4 auch nach längerer *soaking*-Zeit nur sehr schwach besetzt wird. Dies war bei allen beobachteten Formationen des heptanuklearen Clusters der Fall. Eine zweite beobachtete Form der Inkorporation von Gadoliniumionen an Stelle des Clusters wies allerdings nur drei Gadoliniumionen an den Positionen Gd2, Gd3 und Gd4 auf, die gleichmäßig besetzt waren. Diese Form wurde in 30 von 42 analysierten Kristallen gefunden.

4.5 Struktur und Funktion von LgFlo1A

LgFlo1A ist ein Homolog von Flo5A aus der untergärigen Brauhefe *Saccharomyces pastorianus*^[72]. Dieses Flokkulin sorgt nach Abschluss des industriellen Brauprozesses für das Zusammenklumpen und Absinken der Hefe, so dass sie einfach und kostengünstig abfiltriert werden kann. Dieses Flokkulin vermittelt den *NewFlo* genannten Flokkulationsphänotyp, der zusätzlich zu Mannose auch durch Glucose und Maltose zu inhibieren ist^[167].

Es war möglich, das Gen für LgFlo1A aus der Brauhefe *S. pastorianus* zu amplifizieren und in den Expressionsvektor pET28a zu klonieren. Durchgeführte Testexpressionen zeigten die Produktion von LgFlo1A an; es war aber nicht möglich, LgFlo1A löslich zu produzieren. Auch Rückfaltungsversuche schlugen fehl.

Ein Homologiemodell, das mit dem Programm Modeller^[168, 169] erstellt wurde, zeigt, wie auch schon der zuvor durchgeführte Sequenzvergleich (Abb. 4.8), dass in LgFlo1 keine Flo5-Subdomäne vorhanden ist und stattdessen ein kurzer *loop* die β -Stränge 4 und 10 verbindet (Abb. 4.23).

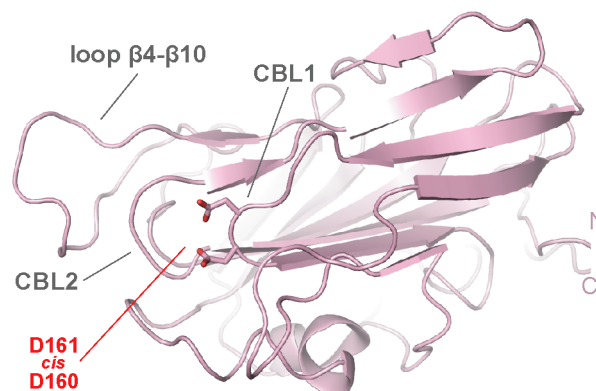


Abb.4.23: Homologiemodell von LgFlo1A. LgFlo1 zeigt ein PA14-ähnliches β -Sandwich. Das für die Funktion notwendige *DcisD*-Motiv sowie die calciumbindenden *loops* CBL1 und CBL2 sind vorhanden, der *loop*, der die Flo5 Subdomäne ersetzt ist mit *loop* β 4- β 10 bezeichnet.

4.6 Struktur und Funktion von Epa1A

Epa1A ist ein Homolog von Flo5A aus der pathogenen Hefe *Candida glabrata*. Es ist ein epitheliales Adhäsion, das Anheftung der *C. glabrata*-Zellen an Wirts-Zellen wie die des Menschen ermöglicht. Wie im Sequenzvergleich zu sehen (Abb. 4.8), enthält Epa1A die PA14-ähnliche Domäne, aber keine Flo5A-Subdomäne. Das für die Calcium-Bindung essentielle Doppel-D ist konserviert und auch das Asparagin im Calcium-bindenden-*loop* 2 ist vorhanden.

Die Klonierung, Aufreinigung und Kristallisation von Epa1A wurde während der Diplomarbeit von Georg Eulenburg durchgeführt^[103]. Kristallisationsexperimente mit Laktose aus Milch als Substrat führten zu Kristallwachstum in dem *sparse-matrix-screen* Classics, Bedingung 92 (0.2 M (NH₄)₂SO₄, 0.1 M MES pH 6.5, 30% PEG 5000 MME)

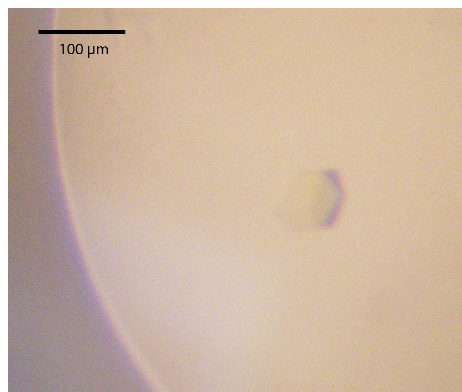


Abb.4.24: Kristall von Epa1A in Classics Suite, Bedingung 92

Dieser Kristall wurde in seiner Mutterlauge mit 20% Glycerin als Cryoprotektant in flüssigem Stickstoff eingefroren und an der ESRF vermessen.

4.6.1 Lösung über Molecular Replacement

Nachdem die Röntgenbeugungsdaten aufgenommen, reduziert und skaliert worden waren, wurde Molekularer Ersatz mit der Flo5A-Struktur versucht. Hierzu wurde zunächst ein Modell generiert, das basierend auf dem Sequenzvergleich in Abbildung 4.25 mit der Software chainsaw^[146] zugeschnitten wurde. Anschließend wurde ein Molekularer Ersatz mit Phaser^[152] durchgeführt, wobei eine Lösung in Raumgruppe C222₁ gefunden wurde. Diese wies einen *log-likelihood-gain* von 39.96 und einen Translationsfunktions-Z-Wert von 6.7 auf, allerdings auch 9 Zusammenstöße in der Packungs-Funktion.


```

Epa1A  DISLASKDPTTFPLGCSFDITTPKKGLSMELYSYDFRKKGSYPCWDAAYLDPNYPRTGYKSHRLLAKVDGVTG
Flo5A  GLVPRGSHMAGATEACLP-AGQRKSGMNINFYQYSLKDSSTYS--NAAYM--AY---GYASKTKLGSVGGQT-

Epa1    NINFYHATKGCTPQLGHLPA----SY-NYP-KPL-----TMTNFTMLLYGYFRPKV
Flo5A   DISIDYNIP--CVSSSGTFPCQEDSYGNWGCKGMGACSNQGIAYWSTDLEFGFYTTPTNVTLEMTGYFLPPQ
          Flo5-Subdomäne

Epa1    TGFHTFTI-SADDLLFVNFGAGNAFDCCRRDSSADHFGNYQAYAI--W-GSKTAKDELTVHLDAGVYYPIRLF
Flo5A   TGSYTFSFATVDDSAILSVGGSIAFECCAQEQPPITSTNFTINGIKPWDGSLPDNITGTVYMYAGYYYPLKVV
          CBL1

Epa1    YNNREYDGALESFTFKTESNENTVSD-FSEYFFSLDD--TEEGCPGLISYDS*
Flo5A   YSNAVSWGTLPIISVELPDG-TTVSDNFEgyVVSFDDDLQSNCITIPDPSIH*
          CBL2

```

Abb.4.25: Sequenzvergleich von Flo5A und Epa1A, das DcisD-Motiv in CBL1 ist konserviert, ebenso wie das Calcium bindende Asparagin in CBL2. Das Fehlen der Flo5-Subdomäne ist eindeutig, die Position aber aufgrund der geringen Sequenzidentität verschoben.

**Tab.4.10: Epa1A
Datensammlungsstatistiken**

Datensatz	MV311
Röntgenquelle	ESRF ID14-2
Datum	24.07.2009
Wellenlänge (Å)	0.933
Detektor	ADSC Q4
Temperatur (K)	100
Raumgruppe	C222 ₁
Zellmaße (Å)	
a	74.64
b	104.33
c	69.79
α, β, γ	90°, 90°, 90°
Moleküle / a.s.u.	1
Auflösung (Å)	19.89 – 1.50 (1.58 – 1.50)
beobachtete Reflexe	174640
einzigartige Reflexe	43249
Vollständigkeit (%)	98.8 (98.7)
Multiplizität	4.0 (4.1)
Mittleres I/σ(I)	14.6 (2.6)
R _{merge} (%)	7.0 (65.5)

Wie im Sequenzvergleich zu sehen ist, wurde das Fehlen der Flo5-Subdomäne nicht vollständig erkannt und so nicht alle Reste der Subdomäne entfernt. Nach einer visuellen Inspektion des Suchmodells wurden N-terminal 15 Aminosäuren, C-terminal 3 Aminosäuren und im Bereich der Flo5-Subdomäne 24 Aminosäuren manuell entfernt.

Mit diesem modifizierten Suchmodell wurde eine einzelne Lösung mit einem *log-likelihood-gain* von 41.45 und einem Translationsfunktions-Z-Wert von 6.6 erhalten. In der Packungs-Funktion traten keine Zusammenstöße mehr auf. Nach Inspektion der Elektronendichte wurden fünf Verfeinerungs-Zyklen mit *refmac5* durchlaufen, bevor mit den Phasen aus dem dann erhaltenen Modell eine automatische Modellierung mit ARP/wARP erfolgreich war.

**Tab.4.11: Epa1A
Verfeinerungsstatistiken**

Auflösung	19.89 – 1.50
R _{work} (%)	18.4
R _{free} (%)	21.8
Reflektionen	
total	41751
test	1498
mittlerer B _{wert} (Å ²)	15.7
r.m.s.d.	
Bindungslänge (Å)	0.013
Bindungswinkel (°)	1.519

Nach weiterer Verfeinerung dieses Modells konnte auch das in Epa1A gebundene Kohlenhydrat identifiziert und in die Struktur integriert werden.

4.6.2 Struktur

In Abbildung 4.26 ist ein Überblick über die Struktur von Epa1A, sowie eine Detailansicht der Kohlenhydratbindungstasche zu sehen.

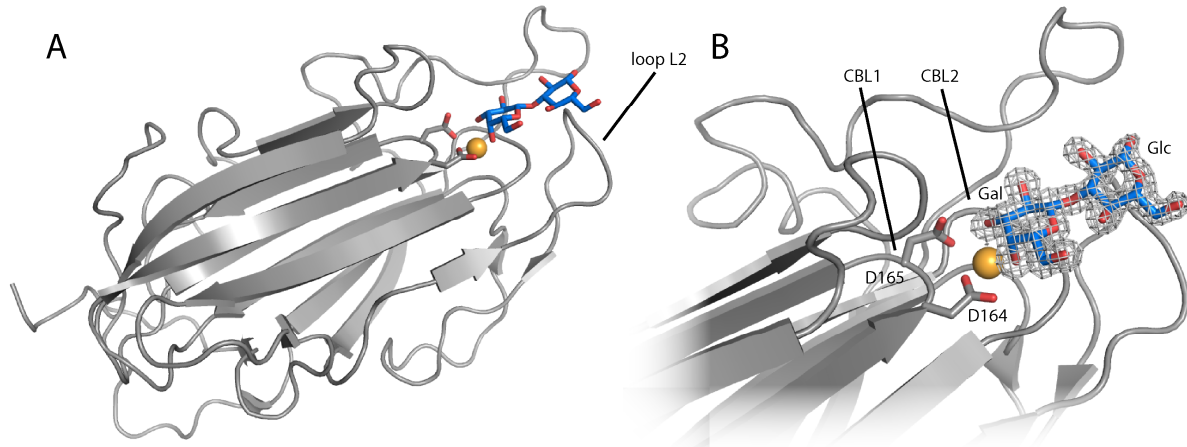


Abb.4.26: **A:** Übersicht der Epa1A-Struktur. Die Struktur zeigt ein PA14-ähnliches β -Sandwich, es ist keine Flo5-Subdomäne vorhanden, diese wird durch den *loop* L2 ersetzt. **B:** Detailansicht der Bindungstasche von Epa1A, die Elektronendichte ist bei 1σ konturiert.

Epa1A zeigt als Hauptfaltungsmotiv ein PA14-ähnliches β -Sandwich. Es ist keine Flo5-Subdomäne vorhanden, ansonsten ähnelt die Struktur Flo5A, mit einem r.m.s.d von 1.2 \AA bei Überlagerung von 95 C_α -Atomen. Die Bindungstasche hat ebenfalls starke Ähnlichkeit zu Flo5A. Das *DcisD*-Motiv in CBL1 ist ebenso vorhanden wie das Calcium-kordinierende Asparagin in CBL2. Das in der Bindungstasche gefundene Kohlenhydrat war allerdings nicht wie erwartet ein Laktosemolekül (Galactose- β -1,4-Glucose), sondern ein Galactose- β -1,3-Glucose-Molekül.

Weitere Untersuchungen an Epa1A sowie zu dessen nativen Liganden wurden von Dr. Manuel Maestre Reyna durchgeführt und diskutiert^[170].

4.7 Struktur und Funktion von Flo11A

Das Flokkulin Flo11 ist ein Sonderfall unter den Flokkulinen aus *S. cerevisiae*. Während die A.Domänen der Flokkuline Flo1, Flo5, Flo9 und Flo10 der PA14-Domäne ähneln und auch untereinander eine hohe Sequenzidentität aufweisen, wird die Flo11A-Domäne einer eigenen, nur in Pilzen vorkommenden, Proteinfamilie zugeordnet (PFAM^[61]: PF10182). Phänotypisch ist Flo11A für die Adhäsion von Hefezellen an apolaren Oberflächen wie Polystyrol, Agar und für Biofilmbildung verantwortlich.

4.7.1 Produktion und Aufreinigung von Flo11A und Σ Flo11A

Nach der Produktion von Flo11A in Origami2 oder SHuffle T7 Express *E. coli* Zellen bei 12 °C, dem Aufschluss der Zellen mittels French-Press und Klärung des Lysats durch Zentrifugation und Sterilfiltration war der erste chromatographische Schritt die Aufreinigung mittels Ni-NTA-Affinitätschromatographie.

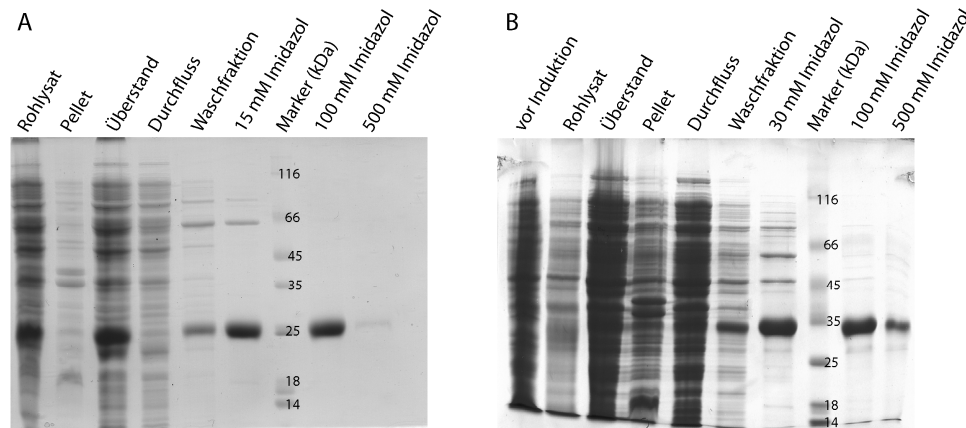


Abb4.27: Reduzierende SDS-Gele des Aufreinigungsverlaufs durch Ni-NTA-Affinitätschromatographie von **A** Flo11A; **B** Σ Flo11A nach präparativer Überproduktion. Beide Flokkuline werden bei einer Imidazolkonzentration von 100 mM annähernd rein erhalten.

Wie in Abbildung 4.27 zu sehen ist, lieferte die Ni-NTA-Chromatographie bei der Elution mit einer Imidazolkonzentration von 100 mM nahezu sauberes Protein sowohl für Flo11A aus dem *S. cerevisiae* Stamm S288c als auch für Σ Flo11A aus dem Stamm Σ 1278b. Bei Flo11A unterscheidet sich die apparente molekulare Masse von 25 kDa leicht von der tatsächlichen molekularen Masse von 23.7 kDa. Dies lässt sich durch den niedrigen isoelektrischen Punkt (pI) dieser Flo11A-Domäne von 5.23 erklären. Bei Σ Flo11A ist dieser Effekt aufgrund des sehr niedrigen pI von 4.39 noch stärker zu beobachten, da die apparente molekulare Masse circa 34 kDa beträgt, während die tatsächliche molekulare Masse bei 25.8 kDa liegt.

Die weitere Aufreinigung mittels Gelfiltrationschromatographie ermöglichte bei beiden Flokkulin-Domänen einen Zugang zu reinem Protein. Es konnten Ausbeuten von 12 mg/L Kultur für Flo11A und von 13 mg/L Kultur für Σ Flo11A erhalten werden.

4.7.2 Kristallisation von Flo11A

Erste Kristallisationsscreens von Flo11A und Σ Flo11A wurden mit den kommerziell erhältlichen Screens Classics, MBC I, MBC II, JCSG+, und PACT, sowie den JCSG Core I-IV Screens durchgeführt. Die Präparation der Platten wurde mit Hilfe des Cartesian 4004 Pipettier-Systems durchgeführt, die Konzentration der verwendeten Proteinlösungen lag

zwischen 30 und 80 mg/mL, das Protein lag zunächst in AM-Puffer bei pH 8 vor. Die Inkubation der fertig gestellten Platten erfolgte bei 4 °C und 18 °C.

Flo11A hatte bereits während der Konzentration durch Ultrafiltration eine hohe Löslichkeit gezeigt, die eine Proteinkonzentration von über 100 mg/mL ermöglicht. Dies bestätigte sich auch in den Kristallisationsansätzen, in denen auch bei hohen Proteinkonzentrationen keine Kristalle erhalten werden konnten. Es zeigten sich häufig Phasentrennungen, während festes Präzipitat stark unterrepräsentiert war.

Um die Löslichkeit von Flo11A zu senken, wurde das Protein in Phosphatpuffer (100 mM, pH 5.2) umgepuffert. Der pH-Wert dieses Puffers liegt nahe am pI des Proteins von 5.23 und sollte somit die Löslichkeit stark herabsetzen. Dennoch ließ sich die Konzentration von Flo11A in diesem Puffer auf über 60 mg/mL erhöhen

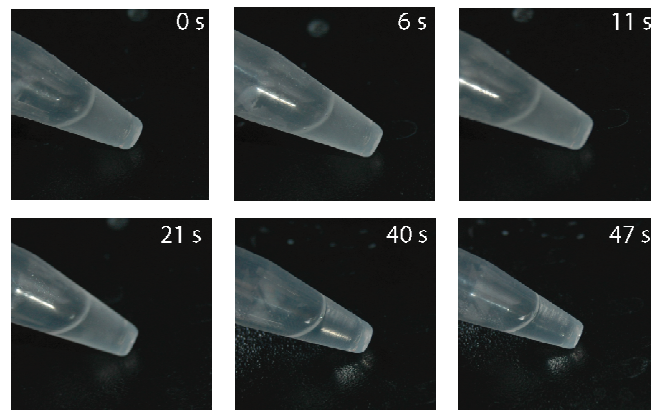


Abb.4.28: Verhalten von Flo11A bei Erwärmen von 0 °C auf 20 °C innerhalb von 47 s

In der Kälte zeigte sich bei pH 5.2 allerdings ein reversibles Ausfallen, das in Abbildung 4.28 dargestellt ist, somit wurde eine Erniedrigung der maximalen Löslichkeit erreicht.

Nach der Umpufferung von Flo11A auf Phosphatpuffer mit einem pH-Wert von 5.2 wurde erneut ein Kristallisationsscreening im *Sitting Drop*-Ansatz mit 2x300 nL Tropfengröße durchgeführt. Dabei kamen die Screens Classics, MBC I, MBC II, JCSG+, und PACT zum Einsatz, die Proteinkonzentration entsprach 57 mg/mL. Nach einer Woche konnte in Bedingung 43 des MBC II-Screens (0.1 M MgCl₂, 0.1 M NaHEPES, 30% PEG 400) bei einer Inkubationstemperatur von 4 °C Kristallwachstum beobachtet werden (Abb. 4.29, A).

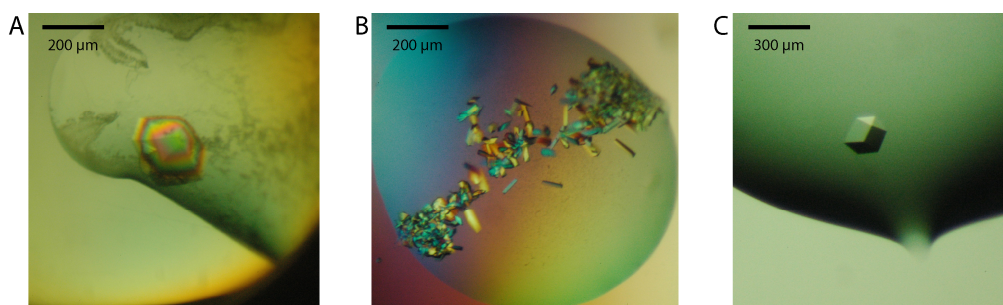


Abb.4.29: **A** erster Kristall (mit Kreuzpolarisation), **B** erstes Seeding (mit Kreuzpolarisation),
C optimiertes Seeding

Reproduktion und Optimierung dieser Bedingung im *Sitting*- sowie im *Hanging-Drop*-Ansatz schlugen zunächst fehl. Per Microseeding mit *seeds* die von dem ersten erhaltenen Kristall gewonnen wurden, ließen sich sowohl in den *Sitting*- als auch in den *Hanging-Drop*-Ansätzen nach zwei bis drei Tagen Kristalle erhalten, die nach circa zwei Wochen kein signifikantes Wachstum mehr zeigten. Für Datensammlungen am Synchrotron konnten die Kristalle direkt in der Mutterlauge in flüssigem Stickstoff eingefroren werden, da 30% PEG 400 bereits als Cryoschutz ausreichten.

4.7.3 Strukturlösung von Flo11A über *Multi-wavelength anomalous dispersion*

Nachdem der erste erhaltene Flo11A-Kristall ein hervorragendes Streuverhalten bis zu einer Auflösung von 1.0 Å gezeigt hatte, wurde zur Lösung des Phasenproblems Selenomethionin-substituiertes Protein hergestellt. Dies geschah in M9 Minimalmedium nach der Methode der metabolischen Repression der Methioninsynthese^[114]. Der Nachweis des Selenomethionineinbaus wurde per ESI-TOF-Massenspektrometrie erbracht, die Daten finden sich im Anhang 7.2. Die erhaltene Masse deutete auf vollständigen Ersatz der fünf Methionine durch Selenomethionine hin, die Abweichung von 3 Da von der theoretischen Masse war allerdings ungewöhnlich.

Die Aufreinigung und Kristallisation des SeMet-Flo11A verlief analog zur Flo11A Aufreinigung, das notwendige *Microseeding* wurde mit *seeds* eines Flo11A Kristalls durchgeführt. Das Kristallwachstum verlief ähnlich wie bei nicht derivatisiertem Flo11A. Kristalle konnten ebenfalls direkt aus der Mutterlauge in flüssigem Stickstoff eingefroren werden.

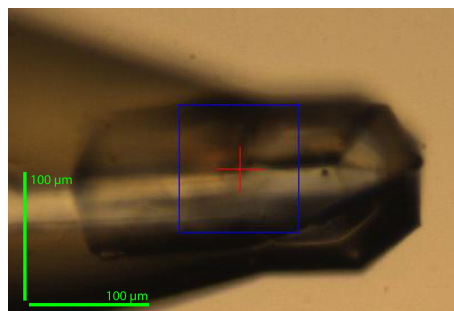


Abb.4.30: Ein SeMet -Flo11A Kristall während der Messung am ESRF

Der in Abbildung 4.30 dargestellte Kristall konnte am ESRF zur Phasierung und Strukturlösung mittels MAD verwendet werden. Dazu wurde zunächst ein Röntgenabsorptionsscan durchgeführt (Abb. 4.31), anhand dessen sowohl der Einbau von Selenomethionin nachgewiesen, als auch die notwendigen Wellenlängen für die Datensätze *Flo11A-peak*, *Flo11A-inflection* und *Flo11A-remote* bestimmt werden konnten.

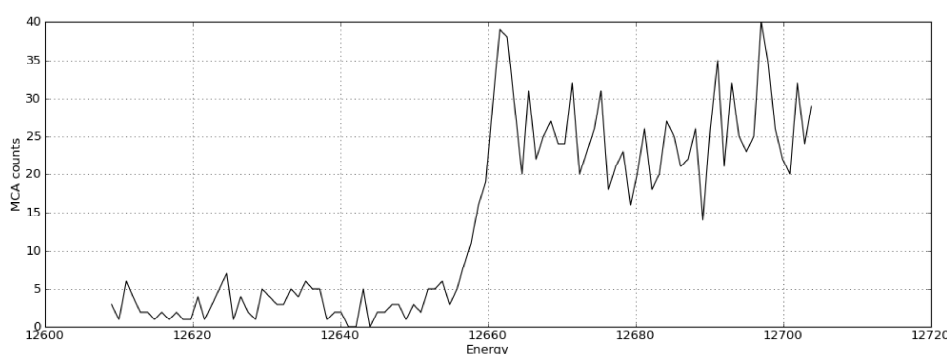


Abb.4.31: Röntgenabsorptionsscan des SeMet-Flo11A Kristalls. Trotz starken Rauschens ist eine deutliche Absorptionskante bei circa 12662 eV (theoretisch: 12657 eV^[166]) zu sehen.

Mit Hilfe dieser Messungen war es möglich per *SHELX_CDE*^[151] erste Phasen zu erhalten. Dabei wurden von *SHELXD* 3 Selenatome mit relevanter Besetzung (100%, 87%, 55%) gefunden. Die Phasen, die aus dem invertierten Schweratom-Modell berechnet wurden, lieferten in der *SHELXE*-Verfeinerung einen besseren Kontrast und eine bessere Konnektivität. Mit diesen Phasen war es möglich, eine automatische Modellierung durch *ARP/wARP*^[159] durchzuführen, bei der 141 von 211 Resten in die Elektronendichte modelliert werden konnten. Der weitere Modellbau wurde durch manuelle Manipulation mit *cool*^[160] und automatische Verfeinerung mit *refmac5*^[161] ausgeführt. Im Verlauf der Verfeinerung zeigte sich, dass nur drei der fünf in Flo11A vorhandenen Methionine in strukturell definierten Bereichen des Proteins vorliegen und demzufolge auch nur drei *Peaks* an anomaler Differenzdichte zu beobachten sind, was mit den Ergebnissen von *SHELXD* korreliert. Die

Statistiken für die zur Lösung verwendeten Datensätze finden sich in Tabelle 4.12, die Statistiken für die anschließende Verfeinerung des Strukturmodells in Tabelle 4.13.

Tab.4.12: Datensammlungsstatistiken SeMet-Flo11A

Datensatz	<i>peak</i>	<i>inflection</i>	<i>remote</i>
Datum	18.09.2010	18.09.2010	18.09.2010
Röntgenquelle	ESRF ID14-4	ESRF ID14-4	ESRF ID14-4
Energie (eV)	12661.9	12659.9	12691.8
Wellenlänge (Å)	0.97921	0.97936	0.9769
Detektor	ADSC Q315r	ADSC Q315r	ADSC Q315r
Temperatur (K)	100	100	100
Raumgruppe	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁
Zellmaße (Å)			
a	30.5	30.5	30.5
b	54.8	54.8	54.9
c	122.0	122.0	122.1
α, β, γ	90°, 90°, 90°	90°, 90°, 90°	90°, 90°, 90°
Moleküle / a.s.u.	1	1	1
Auflösung (Å)	40.77 – 1.9 (2.0 – 1.9)	40.79 – 1.9 (2.0 – 1.9)	40.81 – 1.9 (1.9 – 2.0)
beobachtete Reflexe	114470	108409	108672
einzigartige Reflexe	16106	15943	15963
Vollständigkeit (%)	96.5 (83.9)	95.4 (84.0)	95.3 (85.3)
Multiplizität	6.9 (6.3)	6.8 (6.3)	6.8 (6.3)
Mittleres I/σ(I)	62.9 (45.1)	67.2 (50.2)	74.9 (52.4)
R _{merge} (%)	2.3 (3.1)	2.2 (2.7)	1.9 (2.7)
anomale Vollständigkeit (%)	96.5 (83.9)	94.7 (84.2)	94.7 (85.6)
anomale Multiplizität	3.7 (3.2)	3.6 (3.2)	3.6 (3.2)
anomale Korrelation (%)	88.5 (88.8)	85.2 (85.5)	77.9 (73.0)

**Tab.4.13: Verfeinerungsstatistiken
SeMet-Flo11A**

Auflösung	40.77 – 1.9
R _{work} (%)	17.5
R _{free} (%)	19.9
Reflektionen	
total	15609
test	497
Anzahl Atome	
total	1618
Wasser	121
mittlerer B _{wert} (Å ²)	12.01
r.m.s.d.	
Bindungslänge (Å)	0.02
Bindungswinkel (°)	1.75

4.7.4 Die Struktur der Flo11A-Domäne

Mit Hilfe der durch MAD gelösten Flo11A-Struktur ließen sich auch höher aufgelöste

Tab.4.14: Datensammlungsstatistiken

Röntgenquelle	ESRF ID29
Datum	18.06.2011
Wellenlänge (Å)	0.70847
Detektor	PILATUS 6M
Temperatur (K)	100
Raumgruppe	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁
Zellmaße (Å)	
a	30.5
b	54.8
c	121.9
α, β, γ	90°, 90°, 90°
Moleküle / a.s.u.	1
Auflösung (Å)	40.76 – 0.89 (0.94 – 0.89)
beobachtete Reflexe	789616
einzigartige Reflexe	156350
Vollständigkeit (%)	99.7 (99.6)
Multiplizität	5.1 (4.9)
Mittleres I/σ(I)	13.1 (2.0)
R _{merge} (%)	5.9 (77.9)

Datensätze phasieren. In den Tabellen 4.14 und 4.15 sind die Datensammlungs- und Verfeinerungsstatistiken des mit 0.89 Å höchst aufgelösten Flo11A Datensatzes zu sehen.

**Tab.4.15:
Verfeinerungsstatistiken**

Auflösung	40.76 – 0.89
R _{work} (%)	12.6
R _{free} (%)	13.3
Reflektionen	
total	151392
test	4675
Anzahl Atome	
total	1862
Wasser	248
mittlerer B _{wert} (Å ²)	12.14
r.m.s.d.	
Bindungslänge (Å)	0.011
Bindungswinkel (°)	1.688

In Abbildung 4.32 ist die hoch aufgelöste Struktur von Flo11A und ein dazugehöriges Topologiemodell zu sehen.

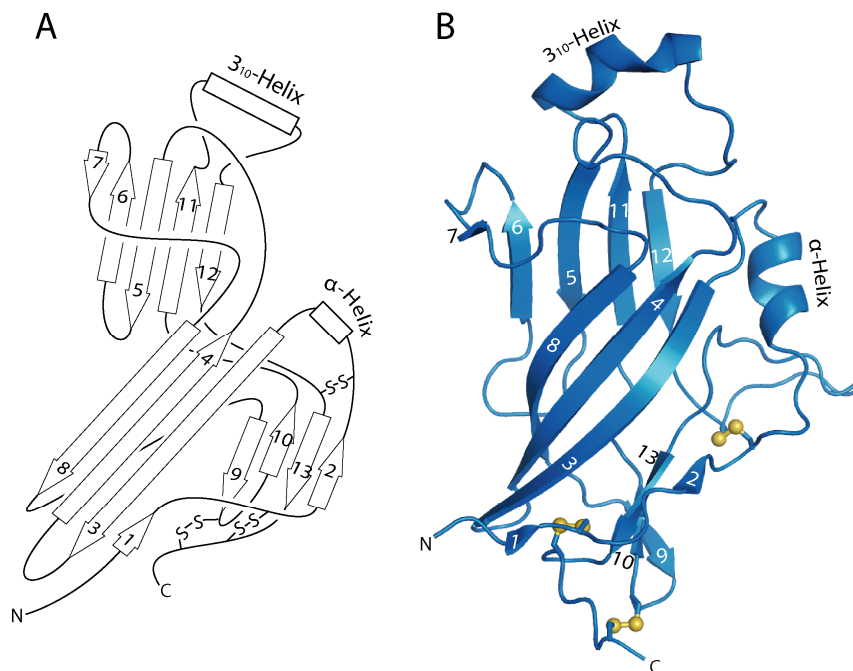


Abb.4.32: **A** Topologiemodell von Flo11A, **B** Struktur von Flo11A. Die β-Stränge sind nummeriert, die Disulfidbrücken sind als Stab- und Kugelmodell dargestellt.

Flo11A zeigt ein bis dato nicht beobachtetes Faltungsmotiv. Die Kerndomäne besteht aus einem β -Sandwich aus drei antiparallelen β -Faltblättern, die von den β -Strängen 1, 3, 4 und 8 (Faltblatt 1); 2, 9, 10 und 13 (Faltblatt 2); sowie 5, 6, 7, 11 und 12 (Faltblatt 3) aufgebaut werden. Eine kurze α -Helix liegt zwischen Faltblatt 2 und Faltblatt 1, eine den Termini gegenübergestellte 3_{10} -Helix besteht zwischen den β -Strängen 11 und 12 aus Faltblatt 3. Die Termini liegen dicht beieinander und sind durch Disulfidbrücken stabilisiert. Eine dritte Disulfidbrücke stabilisiert den *loop*, der die α -Helix enthält. Eine Ähnlichkeit dieses Faltungsmotivs zu bekannten Faltungsmustern ist nicht gegeben. Ein Test auf verwandte Strukturen wurde mit PDBefold^[171] durchgeführt. Die Struktur, die gemäß einem kombinierten Qualitätsfaktor, dem *Q-Score*, am nächsten mit Flo11A verwandt ist, ist das Typ III Modul des menschlichen Fibronektins (PDB: 1OWW) mit einem *Q-Score* von 0.22. Da aber auch dieses Protein nur einen r.m.s.d von 2.84 Å über 83 verglichene Aminosäuren bei einer Sequenzidentität von 6% aufweist, kann nicht von einer signifikanten strukturellen Verwandtschaft gesprochen werden.

4.7.5 CD-Spektroskopie Flo11A und Σ Flo11A

Mit Hilfe der CD-Spektroskopie wurde untersucht, ob die aus verschiedenen *S. cerevisiae*-Stämmen stammenden Flo11A- und Σ Flo11A-Domänen vergleichbare Sekundärstrukturen und eine ähnliche Stabilität aufweisen.

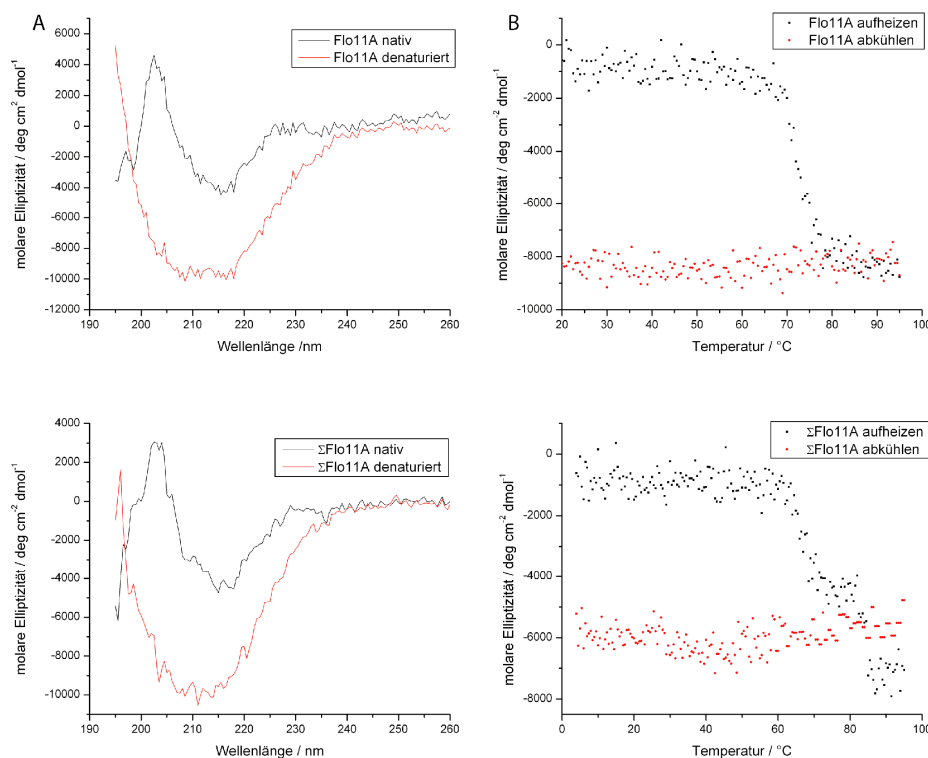


Abb.4.33: A CD-Spektren und B Schmelzkurven von Flo11A und Σ Flo11A. Die Spektren zeigen eine deutliche Ähnlichkeit, die Schmelzpunkte nur geringe Unterschiede zwischen den Flo11A-Domänen.

Wie in den CD-Spektren in Abbildung 4.33 zu sehen ist, unterscheiden sich die Sekundärstrukturen der Flokkulin-Domänen Flo11A und Σ Flo11A nur unwesentlich voneinander. Beide zeigen im nativen Zustand ein deutliches β -Faltblatt Spektrum, das sich nach der thermischen Denaturierung in ein *molten-globule* Spektrum wandelt. Beide Flokkuline zeigen eine sehr gute Temperaturstabilität, allerdings beginnt Σ Flo11A bereits bei 63 °C die Konformation zu ändern und weist einen Schmelzpunkt von circa 67 °C auf, während Flo11A ab einer Temperatur von 68 °C beginnt, seine Sekundärstruktur zu verändern und einen Schmelzpunkt bei circa 73 °C aufweist. Σ Flo11A zeigt allerdings noch einen zweiten Schmelzpunkt jenseits von 80 °C.

4.8 Substratspezifität von Flo11A und Σ Flo11A

4.8.1 Analyse der Flo11A- und Σ Flo11A-Substratspezifität durch das CFG

Mit Hilfe des *Consortium for Functional Glycomics* (CFG) ist es möglich in einem Hochdurchsatzverfahren viele verschiedene Kohlenhydrate auf Bindung an Proteinen zu untersuchen. Dazu wird das Protein mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert und auf einen mit mehreren hundert synthetisch hergestellten Polysacchariden bedruckten Chip gegeben. Nach Waschen dieses Chips ist es möglich, anhand der Fluoreszenz festzustellen, an welche Kohlenhydrate das getestete Protein gebunden hat.

Flo11A und Σ Flo11A wurden sowohl mit His-tag, als auch ohne His-tag nach Thrombin-Spaltung eingesetzt. Die Flokkuline wurden mit AlexaFluor488-Tetrafluorphenylester oder AlexaFluor488-Sulfodichlorphenylester umgesetzt. Diese Reagenzien bilden unter Abspaltung von Tetrafluorphenol oder Sulfodichlorphenol eine Amidbindung am N-Terminus sowie an freien Lysinen. Nach Aufreinigung des markierten Flo11A durch eine Entsalzungssäule wurde eine Probe an das CFG geschickt.

In allen Experimenten konnte keine Kohlenhydratbindung nachgewiesen werden. Dies könnte, neben der Möglichkeit, dass Flo11A und Σ Flo11A keine Kohlenhydrate binden, auch daran liegen, dass die nativen Substrate nicht auf den Glycan-Chips vertreten waren oder die Fluoreszenzmarkierung mit der Bindung interferiert hat.

4.8.2 Soaking Experimente mit Flo11A-Kristallen

Flo11A Kristalle wurden mit verschiedenen möglichen Substraten *gesoakt* (Tab. 4.16), um eventuell vorhandene Bindungsstellen zu entdecken. Alle *soaks* wurden mit und ohne zusätzliche Calciumionen ausgeführt.

**Tab.4.16: getestete *soaking*
Substanzen für Flo11A**

Substanz	Konzentration
Mannose	50 mM – 1 M
Glucose	1 M – 2 M
GalNAc	50 mM – 1 M

Die Strukturen wurden durch molekularen Ersatz gelöst. In keiner Struktur konnte eine signifikante Differenzelektronendichte gefunden werden, die auf eine geordnete Inkorporation der Substrate in den Kristall hingedeutet hätte. Die zugehörigen Datensammlungs- und Verfeinerungsstatistiken finden sich im Anhang 7.1.5.

4.9 Struktur von Sun4-C

Sun4 ist ein *S. cerevisiae* Zellwandprotein mit bisher unbekannter Funktion. Der N-terminale Bereich dieses Proteins besteht aus einem serin- und threoninreichen Bereich von vermutlich geringer struktureller Komplexität. Der C-terminale Bereich enthält die SUN-Domäne, (PFAM: PF03856) die ubiquitär in Ascomyceten gefunden wird, aber sonst in keinen anderen Lebensformen vorkommt. Es wird vermutet, dass Sun4 Glycosidaseaktivität zeigen könnte^[95], eine Deletion führt zu einem Defekt in der vollständigen Zellwand-Septierung. In dieser Arbeit wurde der C-terminale Bereich von Sun4 (G147 – N420) aus *S. cerevisiae* untersucht.

4.9.1 Klonierung und Aufreinigung

Die Klonierung der Expressionskonstrukte von Sun4-C wurde während der Diplomarbeit von Julius Lambo durchgeführt. Die Proteinproduktion erfolgte nach dem Niedrigtemperaturprotokoll, nach dem auch die in dieser Arbeit untersuchten Flokkuline löslich produziert wurden.

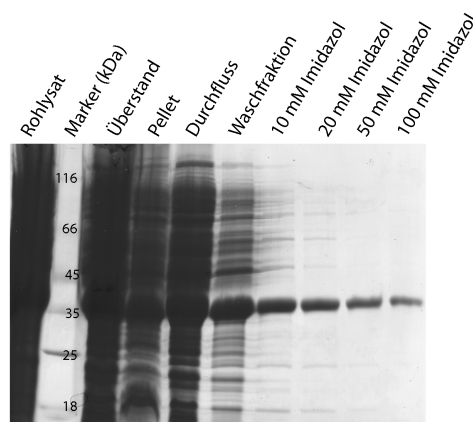


Abb.4.34: Reduzierendes SDS-Gel des Aufreinigungsverlaufs von Sun4-C durch Ni-NTA-Affinitätschromatographie. Ab einer Imidazol-Konzentration von 20 mM wird größtenteils reines Protein erhalten.

Wie in Abbildung 4.34 zu sehen ist, wurde bereits mit Hilfe der NiNTA-Chromatographie der Zugang zu weitgehend sauberem Sun4-C erhalten. Durch eine nachfolgende Größenausschlusschromatographie wurde die Monodispersität des Proteins sichergestellt. Aus einem Liter Kultur konnten 12 mg rekombinantes Sun4-C gewonnen werden.

4.9.2 Kristallisation

Zur Kristallisation von Sun4-C wurden die *sparse-matrix-screens* JCSG Core suites I-IV, sowie PACT automatisiert mit Hilfe des Pipettierroboters Cartesian Honeybee 963 (*Genomic Solutions*) auspipettiert. Die Proteinlösung lag bei einer Konzentration von 40 mg/mL in AM-Puffer vor. Kristallines Material wurde nach wenigen Tagen in einigen Bedingungen des *sparse-matrix-screens* JCSG Core II gefunden, von denen zwei für eine Kristallisationsoptimierung ausgewählt wurden. Diese sind in Tabelle 4.17 angegeben.

Tab.4.17: Kristallisationsbedingungen für Sun4-C

JCSG Core II, Bed. 26		JCSG Core II, Bed. 75	
NaHEPES	0.1 M; pH7.5	MES	0.1 M, PH5.5
PEG400	2%	PEG400	40%
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.5 M	MgCl ₂	0.2 M

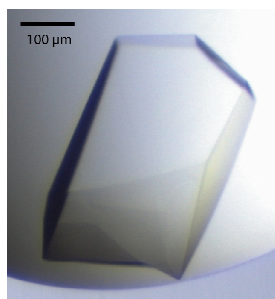


Abb.4.35: Sun4-C-Kristall aus JCSG Core II, Bedingung 26, beobachtet nach 5 Tagen.

Kristalle aus allen erhaltenen Bedingungen wurden auf ihre Röntgenbeugungseigenschaften getestet, wobei sich herausstellte, dass alle erhaltenen Kristalle der gleichen Kristallform angehören.

Da die Kristalle aus Bedingung 26 des JCSG Core II Screens sehr stabil waren und außerdem den gleichen pH-Wert wie die *Gd-soaking*-Lösung aufwiesen, die zur Phasierung von Flo5A verwendet wurde (Tab.4.9), wurde ein Kristall aus einer Optimierungsbedingung von JCSG Core II, für 48 h in dieser Lösung inkubiert, in flüssigem Stickstoff gefroren und anschließend an der FR591 Kupferdrehanode vermessen, um mit Hilfe des anomalen Signals die Sun4-C-Struktur zu phasieren.

4.9.3 Phasierung der Sun4-C-Struktur durch SAD

Zur Phasierung von Sun4-C wurde ein hochredundanter Datensatz des Gadolinium-Derivats MV653 an der FR 591 Kupferdrehanode aufgenommen (Tab. 4.18). Erste Versuche ,das relativ schwache anomale Signal zur Phasierung mittels SAD und SIRAS mit dem Programm *SHELXCDE*^[151] zu nutzen, schlugen fehl. Zwar wurden von *SHELXD* bis zu 4 Schweratome gefunden, und auch die erste Verfeinerung mit *SHELXE* zeigte einen deutlichen Unterschied in Kontrast und Konnektivität der Elektronendichtekarte zwischen den originalen und den invertierten Phasen, die Struktur konnte aber zunächst nicht gelöst werden. Der Durchbruch gelang mit Hilfe der AutoRickshaw-Pipeline^[172]. Diese suchte nach Schweratomen mit *Phaser*^[152], verfeinerte sie mit *MLPhare*^[146], führte danach eine Dichte Modifikation mit *Pirate*^[173] aus, erzeugte ein Polyalanin-Modell mit *SHELXE*^[151], baute in dieses 105 Reste der Sun4-C Sequenz mit Hilfe von *Resolve*^[174] ein und verfeinerte das Modell mit *refmac5*^[161].

Tab.4.18: Datensammlungsstatistiken Sun4-C

Datensatz	Derivat MV653	nativ, MV648	nativ +Mannose MV683
Datum	17.02.2011	18.02.2011	05.04.2011
Röntgenquelle	FR591	ESRF ID14-4	ESRF ID14-4
Wellenlänge (Å)	1.5418	1.0332	0.86702
Detektor	MAR345	ADSC Q315r	ADSC Q315r
Temperatur (K)	100	100	100
Raumgruppe	I222	I222	I222
Zellmaße (Å)			
a	62.9	62.4	62.2
b	98.8	99.2	99.8
c	103.7	102.2	102.0
α, β, γ	90°, 90°, 90°	90°, 90°, 90°	90°, 90°, 90°
Moleküle / a.s.u.	1	1	1
Auflösung (Å)	19.69 – 2.22 (2.34 – 2.22)	36.72 – 1.05 (1.11 – 1.05)	36.68 – 1.2 (1.26 – 1.20)
beobachtete Reflexe	83261	1081470	837388
einzigartige Reflexe	16160	143630	98997
Vollständigkeit (%)	99.5 (98.1)	97.7 (85.8)	99.9 (99.9)
Multiplizität	5.2 (4.9)	7.5 (3.4)	8.5 (5.9)
Mittleres I/σ(I)	29.3 (4.2)	19.9 (2.5)	16.3 (2.0)
R _{merge} (%)	4.0 (35.4)	4.9 (53.5)	6.0 (99.5)
anomale Vollständigkeit (%)	98.0 (95.1)	/	/
anomale Multiplizität	2.7 (2.6)	/	/
anomale Korrelation (%)	75.1 (17.2)	/	/

Mit den Phasen, die aus diesem Modell erhalten wurden, erzeugte *ARP/wARP*^[159] dann ein Sun4-C-Modell, in dem 181 von 295 Aminosäuren der Sun4-C-Sequenz in die Elektronendichtekarte eingebaut waren. Der weitere Modellbau wurde durch manuelle Manipulation mit *oot*^[160] und automatische Verfeinerung mit *refmac5*^[161] ausgeführt.

4.9.4 Die Struktur von Sun4-C

Tab.4.19: Sun4-C Verfeinerungsstatistiken

Datensatz	MV648	MV683
Ligand	/	Mannose, 1 M
Auflösung	36.37 – 1.10	37.08 – 1.20
R _{work} (%)	14.1	15.2
R _{free} (%)	15.7	17.7
Reflektionen		
work	119602	92727
test	7975	6202
mittlerer B _{wert} (Å ²)	12.2	21.3
r.m.s.d.		
Bindungslänge (Å)	0.013	0.018
Bindungswinkel (°)	1.56	1.79

Mit Hilfe der durch SAD gelösten Flo11A-Struktur ließen sich auch höher aufgelöste Datensätze phasieren. In den Tabellen 4.18 und 4.19 sind die Datensammlungs- und Verfeinerungsstatistiken des mit 1.1 Å höchstaufgelösten Sun4-C Datensatzes, sowie eines Mannosederivats zu sehen.

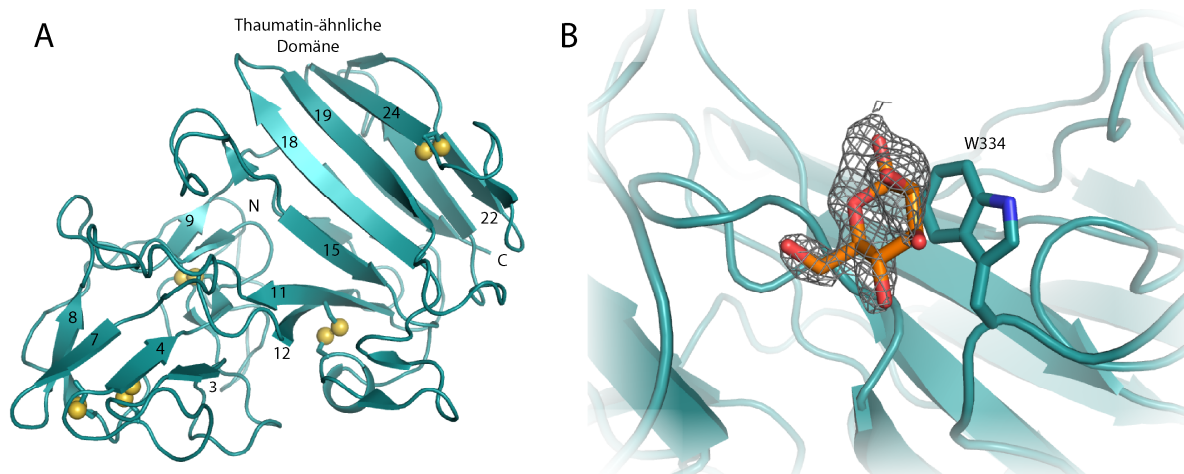


Abb.4.36: A: Überblick über die Sun4-C-Struktur. Die vorderen β-Stränge sind nummeriert. **B:** Nach einem *Soaking* mit hoher Mannosekonzentration zeigt sich an W334 zusätzliche Elektronendichte, die kompatibel mit einer Inkorporation von Mannose ist. Die Elektronendichte ist bei 1 σ konturiert.

In Abbildung 4.36 ist die Struktur von Sun4-C zu sehen. Die Struktur enthält 25 β-Stränge, aufgeteilt in zwei Subdomänen. Die Struktur wird durch fünf Disulfidbrücken stabilisiert. Die 9 N-terminalen β-Stränge bilden eine Subdomäne von bisher unbekannter Faltung, die ein viersträngiges, antiparalleles β-Faltblatt enthält. Die 16 C-terminalen β-Stränge bilden zwei antiparallele, sechs- und siebensträngige β-Faltblätter, die zu einem verzerrten β-Sandwich angeordnet sind. Dieses β-Sandwich ähnelt entfernt einem Thaumatins-Faltungsmotiv.

(PDB: 3G7M), mit einem *Q-Score* von 0.19 bei 122 überlagerten Aminosäuren und einem r.m.s.d. von 2.69 Å^[171].

4.9.5 Substratspezifität von Sun4-C

Da Sun4-C vermutlich Glycosidasefunktionen aufweist, ist anzunehmen, dass es auch bestimmte Kohlenhydratstrukturen binden kann. Da das native Substrat von Sun4-C nicht bekannt ist, wurden *soaking*-Experimente mit hohen Konzentrationen, jeweils 1 M, von Glucose und Mannose durchgeführt. Die Inkubationszeit in der Kohlenhydratlösung betrug 40 Minuten. Während für das Glucose-Experiment keine zusätzliche Elektronendichte in der Struktur gefunden werden konnte, wurde bei dem Mannose-Experiment zusätzliche Elektronendichte gefunden, in die Mannose modelliert werden konnte. Diese geht anscheinend eine π -*stacking*-Interaktion mit dem Tryptophan 334 ein. Dieses befindet sich in β -Strang 16, in der Spalte zwischen den beiden Subdomänen, die aufgrund der Sun4-C-Struktur schon als mögliche aktive Stelle von Sun4 postuliert wurde.

5. Diskussion

Da unizelluläre Pilze wie *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida glabrata* oder *Candida albicans* keine Mittel haben, sich aktiv fortzubewegen, müssen sie sich auf Adhäsine stützen, die ihnen die Möglichkeit geben, sich zu Zellklumpen zusammenzulagern oder sich an Stellen festzusetzen, die ihrem Wohlergehen förderlich sind. In den verschiedenen Spezies steht hierzu eine große Anzahl an verschiedenen Adhäsinen zur Verfügung. So enthält das *S. cerevisiae*-Genom die fünf Flokkuline Flo1, Flo5, Flo9, Flo10 und Flo11^[29], wobei die vier erstgenannten einer Superfamilie mit PA14-Domänen Struktur entstammen^[58], während Flo11 einer eigenen Proteinfamilie zugerechnet wird^[26]. *S. cerevisiae* ist es mit Hilfe dieser Flokkuline zum Beispiel möglich, zusammenzuklumpen und aus einer Suspension abzusinken, wofür in untergärigen Brauereien *Saccharomyces pastorianus* ein Flo5-Derivat, LgFlo1, verantwortlich ist^[72]. Durch Flo11 ist es *S. cerevisiae* möglich, einen Flor zu bilden, der auf einer Hefesuspension aufschwimmt um so in Regionen mit höherem Sauerstoffgehalt zu gelangen^[83, 175]. Außerdem wird Flo11 für die Bildung von Biofilmen auf Kunststoffen und anderen abiotischen Oberflächen verantwortlich gemacht^[18].

Auch die pathogenen Hefen *C. glabrata* und *C. albicans* verfügen über verschiedene Adhäsine. So wurden in *C. glabrata* 23 verschiedene Epa-Gene gefunden^[22], Flo5-ähnliche Adhäsine, die mit unterschiedlichen Spezifitäten an verschiedene Epithelzellen eines Wirtes haften können. In *C. albicans* werden dagegen keine Flo5-ähnlichen Adhäsine gefunden, sondern nur ein Flo11-Homolog, Rbt1^[176]. Aufgrund der Beteiligung von Rbt1 an der Biofilmbildung von *C. albicans* ist dieses Adhäs in der am stärksten verbreiteten humanpathogenen Hefe auch von großem medizinischen Interesse^[177].

Neben den Adhäsinen aus der Zellwand verschiedener Hefen wurde auch das Zellwandprotein Sun4 aus *S. cerevisiae* untersucht. Sun4 enthält am C-Terminus die in Ascomyceten ubiquitär vorkommende SUN-Domäne, dennoch ist seine Funktion nicht vollständig geklärt. Es wird vermutet, dass Sun4 β -Glucanase-Aktivität^[89] zeigt und eine Rolle im Aufbau der Zellwand spielt^[95].

In dieser Arbeit wurden die Flokkuline und Adhäsine Flo5, Epa1 und Flo11 sowie das Zellwandprotein Sun4 strukturell und funktionell charakterisiert.

5.1 Flo5A – Struktur und Funktion

Flo1 und Flo5 sind die dominanten Flokkuline in *S.cerevisiae*^[71] mit einer Sequenzidentität von 94% und einer Sequenzähnlichkeit von 98% in ihrer A Domäne (S23-H/Y271), so dass davon ausgegangen werden kann, dass sie auf Proteinebene nach dem gleichen Mechanismus funktionieren. In dieser Arbeit wurde daher die A Domäne von Flo5, Flo5A eingehend untersucht.

5.1.1 Die Struktur von Flo5A

Die Struktur von Flo5A, die in dieser Arbeit gelöst wurde (siehe 4.1.5) zeigt sowohl erwartete als auch unerwartete Merkmale. Durch Sequenzvergleiche war bereits im Vorfeld bekannt, dass Flo5A topologisch mit der PA14-Domäne verwandt ist, einer Domäne aus dem protektiven Antigen des Anthrax-Toxins^[57]. Diese Domäne war schon zuvor für Kohlenhydratinteraktionen in einer Vielzahl von Proteinen verantwortlich gemacht worden^[58], allerdings war bis dato nicht aufgeklärt, wie eine Kohlenhydratbindung stattfinden kann, da die PA14-Domäne selbst als nicht kohlenhydratbindend eingestuft wurde.

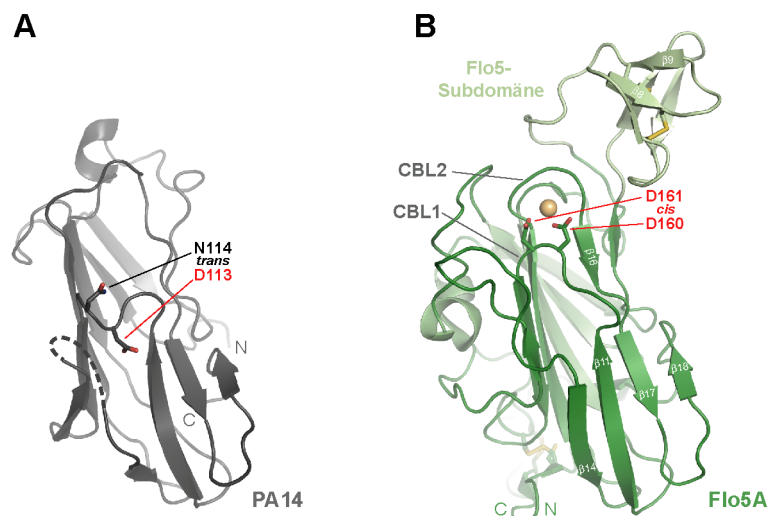


Abb.5.1: Vergleich der PA14-Domäne aus dem protektiven Antigen des Anthrax-Toxins (**A**, PDB-ID, 1ACC) mit der Kohlenhydrat bindenden Flo5A-Domäne (**B**, PDB-ID 2XJP). Es fällt die grundsätzlich identische Faltung der Kerndomäne auf. Allerdings zeigt Flo5A eine Insertion, die Flo5-Subdomäne zwischen den β -Strängen 4 und 10 und ein einzigartiges Calciumbindungsmotiv, das *DcisD*-Motiv, das in PA14 nicht vorhanden ist.

In Abbildung 5.1 ist ein struktureller Vergleich zwischen der PA14-Domäne und der Flo5A-Domäne zu sehen. Abgesehen von der grundsätzlich identischen Faltung der Kerndomäne fällt die Insertion der Flo5-Subdomäne auf. Diese ist in die Kohlenhydratspezifität von Flo5A involviert, da sie die Glutamine Q98 und Q117 enthält, die mit der primären respektive der

sekundären Mannoseeinheit von α -1,2-Mannobiose interagieren. Die Flo5-Subdomäne wird, ebenso wie die Kerndomäne von Flo5A, durch zwei Disulfidbrücken stabilisiert, die im Anthrax protektiven Antigen ebenfalls nicht ausgebildet sind. Die Disulfidbrücken der Flo5A Kerndomäne verbinden den C- sowie den N-Terminus mit dem in der Mitte der Domäne gelegenen *loop* β 12- β 13, und fixieren die Termini der Flo5A Domäne an einer Seite. Dies führt dazu, dass die primäre Kohlenhydratbindungstasche mit dem für die Interaktion essentiellen *DcisD*-Motiv möglichst weit entfernt von der B-Domäne von Flo5 und somit von der Zellwand präsentiert wird, so dass *cis*-Interaktionen dieser Bindungsstelle mit der eigenen Zellwand verhindert werden. Die sekundäre Bindungsstelle, die in einer sauren Spalte der Flo5A Domäne bei hohen Kohlenhydratkonzentrationen gefunden wurde, könnte ebenfalls dazu beitragen, *trans*-Interaktionen der primären Bindungsstelle sicherzustellen, indem sie durch die hohe lokale Konzentration an Mannosiden auf der *cis*-Hefezelloberfläche, mit dieser interagieren könnte. Durch eine solche *cis*-Interaktion der sekundären Bindungsstelle könnte die primäre Bindungsstelle von der Zellwand abgewandt angeordnet werden, um sie für *trans*-Interaktionen frei zu halten. Eine solche Strategie ist beispielsweise von dem neuronalen Zell-Adhäsions-Molekül NCAM bekannt^[178].

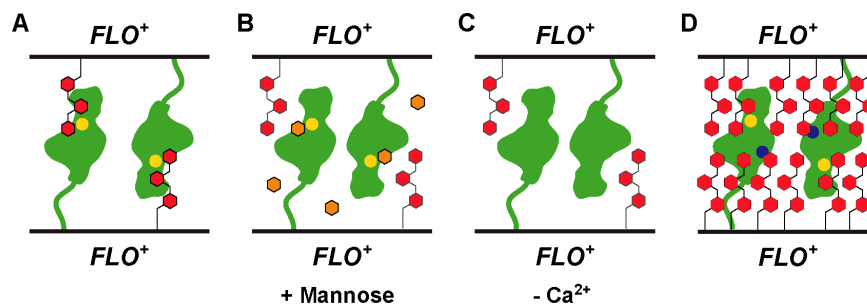


Abb.5.2: Modell der Flo5A-Interaktion. **A** Wenn Flo5 auf beiden interagierenden Zellen vorhanden ist, kommt es zu einer bidirektionalen Interaktion zwischen Flo5 (grün), und Zellwandmannosiden (rot) unter Beteiligung von Calcium (gelb). **B** Ist Mannose (orange) in ausreichender Konzentration vorhanden, blockiert diese die Bindungsstelle von Flo5 und es kommt zu keiner Zell-Zell-Interaktion. **C** Calcium ist essentiell für die Zell-Zell-Interaktion. **D** Die sekundäre Bindungsstelle (blau) kann *cis*-Interaktionen der primären Bindungsstelle verhindern, indem sie mit der eigenen Zellwand Interaktionen eingeht und so die primäre Bindungsstelle auf eine Weise präsentiert wird, die *trans*-Interaktionen bevorzugt.

5.1.2 Die Bindungstasche von *S. cerevisiae* Flokkulinen

Zur Erklärung der Calciumabhängigkeit^[167, 179] der von Flo5A-vermittelte Flokkulation gibt es die Hypothesen, dass Calcium durch die O-Glycosylierung der Flo5B-Domäne komplexiert wird und zu einer Stabilisierung der B-Domäne und damit einer Präsentation der lektinartigen A-Domäne außerhalb der Glycocalix der Zellwand führt^[32] oder dass Calcium direkt in die Interaktion des Lektins mit dem Kohlenhydrat involviert ist und somit Flo5A eine Art von C-

Typ Lektin darstellt^[180]. Durch die Lösung der Flo5A-Struktur wurde die Rolle des Calciums in der Kohlenhydratbindung der PA14-ähnlichen Flokkuline aufgeklärt. Dabei zeigt sich, dass das Calcium direkt in die Bindung involviert ist und ein gebundenes Kohlenhydrat über seine 3- und 4-Hydroxylgruppen mit dem Calcium interagiert.

Die Bindungstasche von Flo5A enthält ein bis dahin nur in zwei Proteinen, nämlich der ATP-Synthase^[181] und der Zn^{2+} -abhängigen Aminoprotease^[182] beschriebenes *DcisD*-Motiv. Dieses Motiv, in Flo5A bestehend aus den durch eine *cis*-Peptidbindung verknüpften Aspartaten D160 und D161, koordiniert das Calciumion. Die Aspartate liegen auf dem *loop* zwischen β 11 und β 12, der daher Calcium bindender *loop* 1, CBL1, genannt wurde. Ein zweiter *loop* zwischen den β -Strängen 15 und 16 koordiniert das Calciumion durch die Seitenkette des Asparagins 224, sowie durch die Rückgratcarbonyle der Aminosäuren Valin 226 und Tryptophan 228. Dieser *loop* wurde daher Calcium bindender *loop* 2, CBL2, genannt.

In die Bindung des Kohlenhydrats selbst sind verhältnismäßig wenige Aminosäurereste involviert, nämlich die Aspartate des *DcisD*-Motivs D160 und D161, das auf dem CBL2 gelegene Serin 227, sowie die in der Flo5A Subdomäne gelegenen Glutamine Q98 und Q117. Da das Glutamin 98 eine wichtige Rolle in der Unterscheidung zwischen Mannose und Glucose spielt, wie auch durch die Variante Flo5A-Q98A nachgewiesen werden konnte (siehe 5.1.4), ist es nicht überraschend, dass LgFlo1A, bei dem die Subdomäne und somit auch das entsprechende Glutamin deletiert wurde, bei der Inhibierung der Flokkulation keine Unterscheidung zwischen Mannose und Glucose zeigt und somit den *NewFlo*-Phänotyp präsentiert.

Während Flo1A die exakt selbe Bindungstasche zeigt wie Flo5A und somit keine Änderung in der Kohlenhydratspezifität erwartet wird, ist bei dem weiter entfernten Flo9A das Serin an Stelle 227 gegen ein Alanin ausgetauscht. Damit entspricht die Bindungstasche für die terminale Mannoseeinheit der Flo5A-S227A-Variante. Außerdem ist in Flo9A das Glutamin 116 gegen ein Prolin ausgetauscht, somit erscheint eine andere Spezifität auch an zweiter Position eines gebundenen Mannosids vorstellbar. Ob sich dies auf eine andere Verknüpfung zweier Mannoseeinheiten wie α -1,3- oder α -1,6-glycosidische Bindungen oder auf vollständig andere Kohlenhydrate bezieht, müsste an Flo9 selbst untersucht werden. Flo10 zeigt im Bereich der Flo5-Subdomäne eine weitere Insertion von 22 Aminosäuren, deren Funktion nicht geklärt ist. Nach bisherigen Berichten ist Flo10 trotz dieses *Inserts* zu einer durch Mannose inhibierbaren Flokkulation fähig^[51].

5.1.3 Flokkulin-ähnliche Domänen in anderen Spezies

Wie bereits in 4.1.7 angedeutet, ist die PA14-Domäne in allen Bereichen des Lebens vertreten, wobei etwa drei Viertel der Organismen, in denen bisher PA14-Domänen gefunden wurden, zu den Bakterien gehören und ein Viertel zu den Eukaryoten. Von archaealen PA14-Proteinen sind bisher nur neun Sequenzen in neun verschiedenen Spezies bekannt^[61]. Da in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, dass das *DcisD*-Motiv für die Funktion von Flo5A essentiell ist, wurde in einem multiplen Sequenzvergleich der 1408 bisher bekannten PA14-Domänen-Sequenzen bestimmt, wie viele der PA14-Domänen zwei konsekutive Aspartate an einer äquivalenten Position zeigen und damit möglicherweise ein *DcisD*-Motiv aufweisen. Bei dieser Analyse zeigten 655 Sequenzen und damit 46.5% der PA14-Domänen ein mögliches *DcisD*-Motiv und damit auch eine mögliche Glycaninteraktion.

5.1.4 Die Kohlenhydrat-Spezifität von Flo5A und dessen Varianten

Als nativer Ligand für Flo5A konnte in dieser Arbeit die auf der *S. cerevisiae*-Oberfläche in großer Anzahl vorkommende Struktur von terminaler α -1,2-Mannobiose bestimmt werden^[183-185]. Die Affinität liegt mit 3.5 ± 0.3 mM im niedrig millimolaren und somit schwachen Bereich. Dies ist allerdings für Lektine nicht ungewöhnlich und die hohe Anzahl von Flo5A auf der Zelloberfläche (bis zu 10^6 Moleküle pro Zelle) führt durch erhöhte Avidität dennoch zu einer stabilen Bindung zwischen Hefezellen^[24, 186]. Der Einfluss verschiedener Varianten von Flo5A auf die Flokkulation wurden sowohl *in vitro* als auch *in vivo* getestet, die *in vivo* Flokkulationstests wurden von Dr. Stefan Brückner durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 5.3 zu sehen.

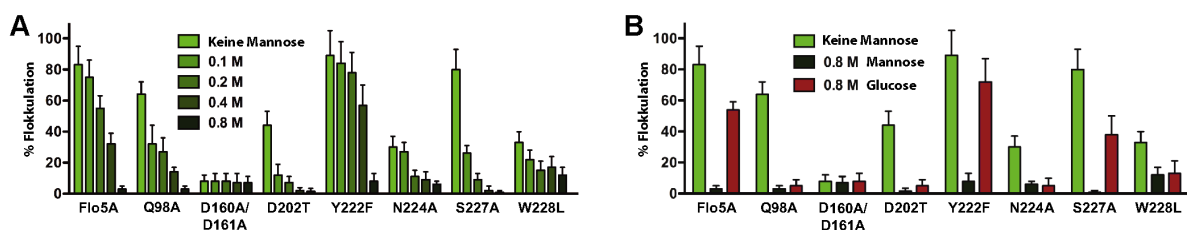


Abb.5.3: Einfluss verschiedener Varianten von Flo5A auf die Flokkulationsfähigkeit^[30]. **A** Die Varianten Flo5A-Q98A, Y222F, und S227A flokkulieren ähnlich gut wie der Flo5A Wildtyp. Die Flokkulation von Q98A und D202T lässt sich durch geringere Konzentrationen von Mannose inhibieren. Die Varianten D160A/D161A, N224A und W228L zeigen keine oder nur schwache Flokkulationsphänotypen. **B** Die Flokkulation von Q98A und D202T lässt sich im Gegensatz zum Wildtyp auch durch Glucose inhibieren.

Die *in vitro* nicht gut löslich zugänglichen Varianten, Flo5A-D160A/D161A, N224A und W228L zeigen auch bei den Flokkulationstests die geringste Aktivität. Dies kann sowohl auf

eine nicht korrekte Faltung, beziehungsweise starke Destabilisierung der Flo5A-Domäne hindeuten, als auch auf eine inhibierende Wirkung der Punktmutation auf ein korrekt gefaltetes Flokkulin. Durch Strukturaufklärung und CD-Spektroskopie wurde festgestellt, dass die Variante Y222F weder zu einer Konformationsänderung des *DcisD*-Motivs führt, noch dass diese Variante weniger stabil als der Flo5A-Wildtyp ist. Dies äußert sich auch in den Flokkulationstests, bei der sich Flo5A-Y222F entsprechend dem Flo5A-Wildtyp verhält. Da ein Tyrosin an dieser Stelle aber in 108 von 1408 bekannten PA14-vorkommt, ist es möglicherweise zur Stabilisierung des *DcisD*-Motivs in anderen Proteinen erforderlich.

Interessanterweise lässt sich die durch die Varianten Flo5A-D202T und S227A vermittelte Flokkulation leichter durch Mannose inhibieren als dies beim Flo5A-Wildtyp der Fall ist. Dies deckt sich mit den durch Fluoreszenzspektroskopie gemachten Beobachtungen, dass die Affinität der Varianten zu Mannose in der Variante S227A dreimal so hoch und in der Variante D202T zwei Mal so hoch ist wie im Flo5-Wildtyp. Die Flokkulation der Variante D202T lässt sich, wie schon von Kobayashi 1998 beschrieben^[44], neben Mannose auch durch Glucose inhibieren und entspricht damit dem *NewFlo*-Typ. Auf molekularer Ebene konnte der Grund für diese Änderung in der Spezifität nicht abschließend aufgeklärt werden, da die D202T-Punktmutation sich auf einem circa 17 Å von der Bindungstasche entfernten *loop* befindet. Dieser *loop* ändert durch die Mutation allerdings seine Vorzugskonformation und beeinflusst so möglicherweise das Solvensnetzwerk auf der Proteinoberfläche.

Die Flokkulationsfähigkeit der Variante Flo5A-Q98A ist ähnlich der des Flo5A-Wildtyps und lässt sich auch durch ähnliche Konzentrationen von Mannose inhibieren. Allerdings ist die durch diese Variante vermittelte Flokkulation ebenfalls durch Glucose zu inhibieren. Dies war aus der Struktur vorhergesagt worden, da Q98 mit der 2-Hydroxylgruppe einer gebundenen terminalen Mannoseeinheit interagiert und so in der Lage ist, eine Unterscheidung zwischen Mannose und Glucose, die sich nur in der Position dieser Hydroxylgruppe unterscheiden, herbeizuführen. In der Kristallstruktur der Variante Flo5A-Q98A konnte dabei festgestellt werden, dass die Glucose, im Gegensatz zur Variante D202T, zwar einen anderen Bindungsmodus als die Mannose einnimmt, aber dennoch bei relativ geringen Konzentrationen von 50 mM in der Elektronendichte definiert werden kann.

5.1.5 Vergleich der Affinitäten von Flo5A mit den Flokkulinen Flo1A und LgFlo1A

Vor und im Verlauf der Erstellung dieser Arbeit wurden von anderen Gruppen die Flokkuline Flo1A aus *S. cerevisiae* von Goossens et al.^[187] und LgFlo1A aus *S. pastorianus* von Groes et al.^[188] auf ihre Bindungsaffinitäten zu verschiedenen Kohlenhydraten untersucht. Die A-Domänen wurden im Fall von Flo1 in *S. cerevisiae* und im Fall von LgFlo1 in *Pichia pastoris* produziert. Somit waren beide Flokkulin-Domänen posttranslational modifiziert. Während für Flo1 sowohl N- als auch O-glycosidische Modifizierungen gefunden wurden, wurde die Art der Glykosylierung für LgFlo1 nicht überprüft. Beide Gruppen führten zur Analyse der Bindungsspezifität Fluoreszenztitrationen mit möglichen Liganden durch. Dabei wurden Bindungsaffinitäten gefunden, die von denen in dieser Arbeit bestimmten deutlich abwichen. Für LgFlo1 wurde eine Affinität für Mannose von $0.77 \text{ mM} \pm 0.028 \text{ mM}$ gefunden, ein Wert der ungefähr um den Faktor 35 höher liegt, als die für Flo5A bestimmte Affinität von $29.3 \pm 3.6 \text{ mM}$. Allerdings scheint die Affinität von Flokkulinen relativ stark variabel, da bereits mit der Variante Flo5A-S227A eine Affinitätsverbesserung um den Faktor 3 für Mannose erreicht werden konnte. Somit erscheint der für die LgFlo1A Domäne, bei der an zu Serin 227 äquivalenter Stelle ebenfalls ein Alanin vorliegt und außerdem noch das Valin 226 gegen ein Lysin ausgetauscht ist, bestimmte Wert für die Dissoziationskonstante realistisch. Im Falle von Flo1A wurden für die Bindung von Mannose und verschiedenen Mannosiden deutlich höhere Affinitäten bestimmt. Dabei kam ein Modell mit zwei hypothetischen Bindungsstellen, einer hochaffinen und einer niedrigaffinen zum Einsatz. Obwohl Flo5A über eine sekundäre Bindungsstelle verfügt, die in Flo1A vollständig konserviert ist, erscheint dieses Modell angesichts der von Goossens et al.^[187] verwendeten geringen maximalen Ligandkonzentration von 100 mM nicht realistisch. In der vorliegenden Arbeit konnte eine Besetzung der sekundären Bindungsstelle erst ab 500 mM Ligandkonzentration und ausschließlich mit einem Monosaccharid beobachtet werden. Auch liegt die in Flo5A beobachtete sekundäre Bindungsstelle in einer Distanz von mindestens 14.3 Å zum nächstgelegenen Tryptophan, so dass eine Fluoreszenzauslöschung aufgrund einer Besetzung derselben unwahrscheinlich wäre. Das richtige Modell für den nicht-linearen Fit ist also die in dieser Arbeit verwendete spezifische Bindung mit einer Bindungsstelle. Interessanterweise liegen für die niedrig affine Bindungsstelle in Flo1A die Affinitäten in ähnlichen Bereichen wie sie für Flo5A gefunden wurden (Tabelle 5.1).

Tab.5.1 Bindungsaffinitäten von Flo1A und Flo5A / mM

Ligand	Flo1A ^[187]		Flo5A
	Hochaffin	Niedrigaffin	
Mannose	0.057 ± 0.02	36.7 ± 6.3	23.3 ± 3.6
α-1,2-Mannobiose	0.206	8.47	3.5 ± 0.3
α-1,3-Mannobiose	0.150	10.99	n.b.
α-1,6-Mannobiose	0.148	17.55	n.b.

Bei hypothetischer Auswertung der Fluoreszenzdaten dieser Dissertation nach einem Modell das von zwei spezifischen Bindungsstellen ausgeht, werden für Mannose die Affinitäten $K_D(\text{HA}) = 0.189 \text{ mM}$ und $K_D(\text{NA}) = 32.02 \text{ mM}$, sowie für α-1,2-Mannobiose die Affinitäten $K_D(\text{HA}) = 0.228 \text{ mM}$ und $K_D(\text{NA}) = 4.5 \text{ mM}$ gefunden, die den Werten von Goossens *et al.* ähneln. Wie bereits erwähnt, wurde in dieser Arbeit aber von der Grundvoraussetzung ausgegangen, dass das Flokkulin zwei spezifische Bindungsstellen aufweist. Die Annahme von Goossens *et al.* beruht ausschließlich auf einem vorgeblich qualitativ höherwertigen, nicht-linearen Fit für zwei spezifische Bindungsstellen. Ein Scatchard-Plot, bei dem der Quotient aus Fluoreszenzquench und Ligandkonzentration gegen die Ligandkonzentration aufgetragen wird, sollte bei zwei spezifischen Bindungsstellen zwei verschiedene lineare Zusammenhänge aufzeigen. Zur Validierung wurden die Daten aus dieser Dissertation auf diese Weise aufgetragen.

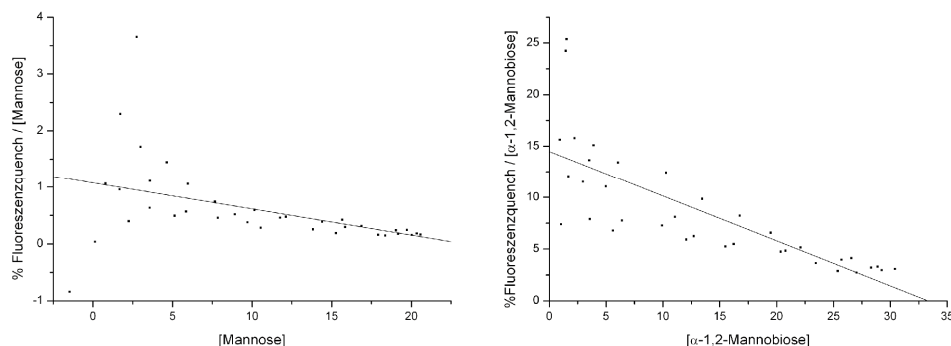


Abb.5.4: Scatchard-Plot der Fluoreszenztitrationsmessreihen mit Mannose und α-1,2-Mannobiose. Trotz ansteigender Streuung bei geringen Ligandkonzentrationen ist deutlich, dass nur ein einfacher linearer Zusammenhang besteht und somit auch nur eine spezifische Bindungsstelle vorhanden ist.

Aus den Scatchard-Plots wird deutlich, dass nur eine spezifische Bindungsstelle für Glycane in Flo5A vorkommt. Aufgrund der hohen Konservierung von 96% in der A-Domäne und 100% in der Nähe der Bindungsstelle muss dies auch für Flo1A gelten. Somit haben die niedrigen Dissoziationskonstanten die für Flo5A bestimmt wurden auch für Flo1A Gültigkeit.

5.1.6 Flo5A als *Greenbeard*-Gen

Greenbeard-Gene oder egoistische Gene sind ein von Richard Dawkins^[189] beschriebenes Phänomen der theoretischen Biologie. Dabei wird davon ausgegangen, dass nicht immer

besser angepasste Organismen, wie von Darwin beschrieben, die treibende Kraft der Evolution sind, sondern, dass viel mehr einzelne Gene altruistische Verhaltensweisen gegenüber anderen Trägern des entsprechenden Gens zeigen und somit nicht das Überleben des Organismus, sondern den Fortbestand dieses Gens zum Ziel haben. Um einen solchen Effekt zu erzielen, muss ein Gen drei Bedingungen erfüllen, nämlich sich in einem Organismus zu erkennen geben, andere Träger dieses Gens zu erkennen und eine altruistische Verhaltensweise auszuüben^[190, 191]. Ein grundsätzliches Problem der *Greenbeard*-Theorie stellen sogenannte *cheater* dar, Zellen, die sich als Genträger ausgeben und damit in den Genuss des altruistischen Verhaltens kommen, ohne tatsächlich den energetischen Aufwand zu betreiben, den die Bereitstellung des altruistischen Verhaltens verlangt. Ohne effektive Erkennung von *cheatern* hätte also ein *Greenbeard*-Gen keine Chance, die Evolution zu überstehen. Im Jahr 2008 wurde das Gen des Flo5-Homologs Flo1 als egoistisches Gen beschrieben^[192]. Hierbei stellt die Flockenbildung das altruistische Verhalten dar, da in der Flockenmitte eingebettete Hefezellen gegen verschiedene fungizid wirkende Agenzien geschützt sind, während die am Flockenrand befindlichen Zellen getötet werden.

Durch die Aufklärung der Struktur und der Funktionsweise von Flo5A konnte die molekulare Grundlage für das *Greenbeard*-Verhalten von Flokkulinen aufgeklärt werden.

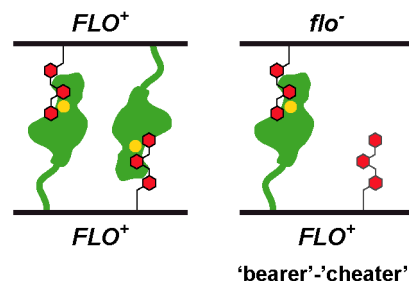


Abb.5.5: Schematische Darstellung der Interaktion zwischen zwei Flokkulin-Trägern (*bearern*), sowie zwischen einem Flokkulin-Träger und einem *cheater*^[30].

In diesem Modell nimmt eine Hefe, die keine Flokkuline produziert, die Rolle des *cheaters* ein. Sie muss nicht den Energieaufwand für die Produktion der Flokkuline auf sich nehmen, wird aber dennoch in eine Flocke integriert, da sie durch ihre Oberflächenglykosylierung von Flokkulinen anderer Zellen erkannt wird. Sie wird sich aber auch leichter wieder von der Flocke lösen, da ihre Verbindung zu den anderen Hefezellen nur unidirektional ist. Dies führt dazu, dass innerhalb einer Flocke die relative Konzentration an Flo5-Trägern höher ist, während in der Peripherie der Flocke die relative Konzentration von *cheatern* höher ist, so dass diese durch fungizide Agenzien als erste getötet werden und den Flo5-Trägern Schutz bieten.

5.2 Die Adhäsın-Domäne von Epa1

Candida glabrata verfügt über eine Vielzahl von Epa-Adhäsinen, die eine zu Flokkulinen ähnliche Gesamtstruktur mit einer N-terminalen PA14-Domäne, einer mittleren serin-threoninreichen Domäne und einer C-terminalen Domäne, die ein Motiv für die Verknüpfung eines GPI-Ankers enthält, aufweist^[21, 74]. Trotz der geringen Sequenzidentität der Epa1 A-Domäne von circa 25% zu Flo5A fällt im Sequenzvergleich (Abb. 4.8) auf, dass die für eine Kohlenhydratinteraktion notwendigen Reste wie das *DcisD*-Motiv als auch das calciumkoordinierende Asparagin N224 (Flo5A) in Epa1A konserviert sind. Auch die Disulfidbrücken des PA14-Domänen Anteils sind konserviert, die Flo5-Subdomäne fehlt allerdings. Daher wurde darauf geschlossen, dass Epa1 eine Kohlenhydratinteraktion ähnlich Flo5A eingeht, allerdings sicherlich eine andere Spezifität aufweist, da die Aminosäuren, die in Flo5 mit den Liganden agieren, größtenteils ausgetauscht wurden.

5.2.1 Vergleich der Adhäsın-Domänen von Flo5 und Epa1

Es war möglich, die Epa1A-Domäne durch einen molekularen Ersatz mit der Flo5A-Domäne zu lösen. Dies zeigt, dass trotz der geringen Sequenzidentität eine recht große strukturelle Verwandtschaft besteht, die sich auch in dem geringen *rmsd* der beiden Proteine von 1.251 Å bei 104 verglichenen C α -Atomen niederschlägt.

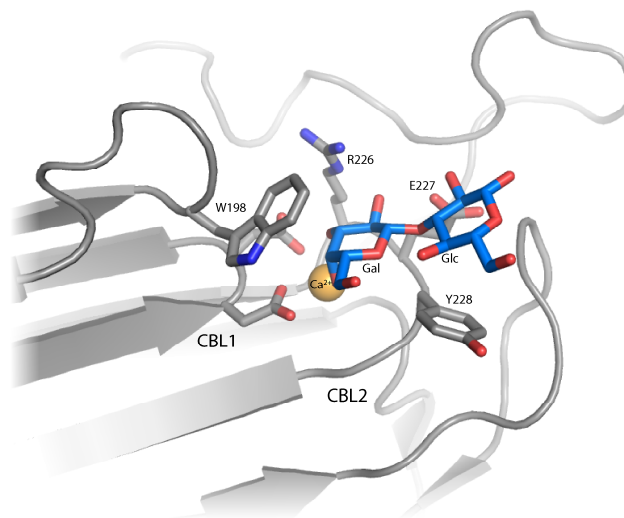


Abb.5.6: Die Bindungstasche von Epa1A mit gebundener Galactose- β 1,3-Glucose. CBL1 mit dem *DcisD*-Motiv, gebildet aus D164 und D165, sowie CBL2 mit Aminosäureseitenketten von R226, E227 und Y228 sind eingezeichnet. Alle in Stab-Darstellung gezeigten Aminosäuren liegen in einem Abstand von maximal 3.5 Å um das Disaccharid.

Wie vermutet zeigt auch Epa1A ein *DcisD*-Motiv und auch ansonsten eine zu Flo5A sehr ähnliche Faltung im Bereich der Bindungstasche. Interessanterweise ist das Glycan in einem

anderen Modus gebunden als in Flo5A. Zwar koordinieren in beiden Strukturen die 3- und 4-Hydroxylgruppen der terminalen Glucanreste das Calciumion, doch ist der Galactoserest in Epa1A im Vergleich zum Mannoserest in Flo5A um 180° verkippt. Dies ist notwendig, um ein β -glycosidisch verknüpftes Glycosid in der Bindungstasche zuzulassen. Die als Verunreinigung von Lactose als guter Ligand für Epa1A gefundene Galactose- β 1,3-Glucose ähnelt einem möglichen nativen Liganden, dem N-Acetyl-Lactosamin. Mit diesem Glycosid, das auf glycosylierungsdefizienten Säugerzellen präsentiert wird, wurde *in vivo* Interaktion mit Epa1A beobachtet^[76].

Die mit dem Glycan interagierenden Aminosäuren unterscheiden sich zwischen Epa1A und Flo5A stark. Da der CBL2 von Flo5 nur relativ kleine Aminosäuren, nämlich A225, V226 und S227 trägt, interagieren deren Reste, von S227 abgesehen, nicht mit dem Glycan. Der CBL2 von Epa1A trägt dagegen an der Stelle dieser Aminosäuren R226, E227 und Y228, also große, geladene oder polare Reste, die starke Wechselwirkungen mit dem gebundenen Disaccharid eingehen können. Der hydrophobe Anteil des Galactoserests wird von Tryptophan 198 abgedeckt und so stabilisiert. Ein in Flo5A auf diesem *loop* ebenfalls vorhandenes Tryptophan ist nicht in die Glycanerkennung involviert. In den verschiedenen Varianten der Epa-Familie ist der Bereich des CBL2 hypervariabel^[77], daher wird vermutet, dass die postulierte Vielseitigkeit der Epa-Proteine in Bezug auf ihre Glycanspezifität hauptsächlich von diesem Bereich ausgeht^[170].

5.2.2 Vergleich der Kohlenhydrataffinität von Flo5A und Epa1A

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die Affinität von Flo5A zu seinem nativen Liganden im niedrigen millimolaren Bereich liegt. Diese schwache Affinität wird zum einen auf eine mögliche Avidität vieler Flo5A Domänen auf der Hefezelloberfläche zurückgeführt, zum anderen aber auch auf die für *S. cerevisiae* nützliche Möglichkeit, sich wieder aus einem Aggregat zu lösen, sollten sich die Umweltbedingungen ändern. Für *C. glabrata* hingegen ist es nützlich eine einmal gebundene Wirtszelle nicht mehr zu verlieren, daher wird eine höhere Affinität für den nativen Liganden von Epa1A erwartet. Tatsächlich wird für einen möglichen nativen Liganden, das T-Antigen (Galactose- β -1,3-N-Acetyl-Galactosamin) eine Dissoziationskonstante von $1.4 \pm 0.1 \mu\text{M}$ gefunden^[170]. Somit liegt die Affinität von Epa1A zu seinem Liganden ungefähr um den Faktor 1000 höher als dies bei Flo5A der Fall ist.

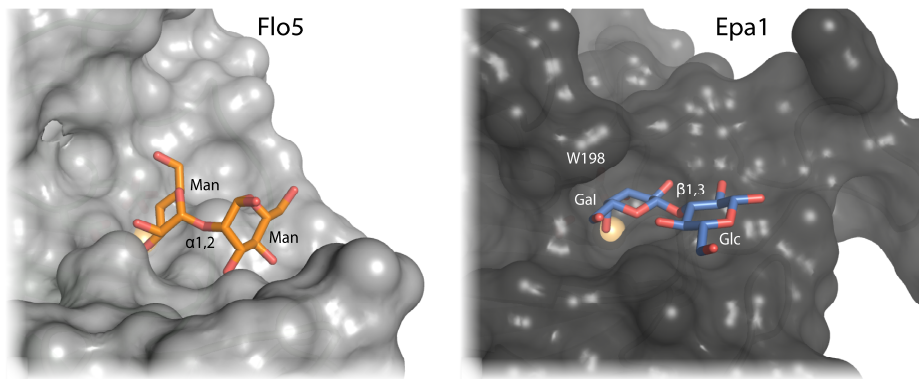


Abb.5.7: Vergleich der Bindungstaschen von Flo5A und Epa1A. In beiden Bindungstaschen sind die Kohlenhydrate gezeigt, die in den erstellten Kristallstrukturen am besten in der Elektronendichte definiert waren. Während Flo5A eine relativ offene, für das Solvens zugängliche Bindungstasche zeigt, ist die Bindungstasche von Epa1A insbesondere im Bereich des Galactoserests deutlicher begrenzt, was zu einem großen Teil W198 zugeschrieben werden kann.

In Abbildung 5.7 ist zu sehen, dass Flo5 eine Bindungstasche aufweist, die nur schwach gegenüber Lösungsmittelatomen abgeschirmt ist, während Epa1A eine deutlich engere Bindungstasche zeigt, die eine größere Interaktion mit dem gebundenen Kohlenhydrat eingeht. Dies äußert sich auch in den Interaktionsflächen, die die einzelnen Glycoside mit der jeweiligen A-Domäne aufweisen. Diese konnten mit PDBePISA berechnet werden^[193]. Während bei Flo5A die nicht reduzierende Mannoseeinheit eine Interaktionsfläche von nur 132.5 \AA^2 aufweist und 58.3% der Oberfläche der Mannose mit dem Protein interagieren, zeigt bei Epa1A die nicht reduzierende Galactoseeinheit eine Interaktionsfläche von 160.4 \AA^2 während 73.1% der Oberfläche der Galactose mit dem Protein in Kontakt stehen. Bei den reduzierenden Glycosideinheiten zeigt sich ein weniger differenziertes Bild. Während bei Flo5A die nicht reduzierende Mannoseeinheit eine Interaktionsfläche von 112.6 \AA^2 aufweist und 47,8% der Oberfläche der Mannose mit dem Protein interagieren, zeigt sich bei der nicht reduzierenden Glucoseeinheit in Epa1A eine Interaktionsfläche von 110.7 \AA^2 , bei einem interagierenden Oberflächenanteil der Glucose von 41.3%.

Aus der strukturellen Analyse zeigt sich, dass - ein Großteil der stärkeren Interaktion von Epa1A mit seinem Liganden aus der Bindung des terminalen Galactoserests hervorgeht. Hierfür wiederum zeichnet zu großen Teilen das Tryptophan W198 verantwortlich, das hydrophobe Wechselwirkungen mit dem Galactosid ausbildet.

5.2.3 Ausblick

In Bezug auf die diverse Epa-Familie sind Untersuchungen zur Kohlenhydratspezifität verschiedener Epa-Varianten denkbar. Dies könnte durch Punktmutation von Epa1 oder durch

Produktion der nativen Epa-Varianten gelingen. Im besten Fall wäre es möglich eine Bibliothek von möglichen Epa-Liganden zu erstellen, die es im Zusammenhang mit der Kenntnis verschiedener Glycosylierungsmuster auf Epithelzellen ermöglichen würde, den Mechanismus einer *C. glabrata* Infektion besser zu verstehen. Ultimativ könnte dies zu neuen Behandlungsmöglichkeiten für Candidiasis führen. Viele Arbeiten in dieser Richtung wurden schon erfolgreich von Dr. Manuel Maestre Reyna durchgeführt und diskutiert^[170].

5.3 Struktur und Funktion von Flo11A

Flo11 wurde 1996 entdeckt und zunächst als klassisches Flokkulin entsprechend Flo1 und Flo5 eingeordnet. Diese Einschätzung basierte auf einer Sequenzidentität zwischen Flo1 und Flo11 von 37%, welche allerdings hauptsächlich auf die B-Domänen zurückzuführen ist und auf der insgesamt ähnlichen Gesamtstruktur mit A-, B- und C-Domäne. Außerdem wurde ein calciumabhängiger Flokkulationsphänotyp in *Saccharomyces diastaticus* beobachtet, der in einer Flo11-Deletionsvariante nicht auftritt^[48].

1998 wurde Flo11 dann sowohl für pseudohyphales Wachstum als auch für invasives Wachstum in Agar verantwortlich gemacht^[82], 2001 wurde die Fähigkeit von Flo11 produzierenden Zellen erkannt, Biofilme auf Kunststoffen wie Polystyrol, Polypropylen und Polyvinylchlorid sowie Matten auf Agar zu bilden. Hierbei wurde vermutet, dass Flo11 sowohl Zell-Zell als auch Zell-Oberflächen Interaktionen vermittelt^[18]. 2004 wurde die Notwendigkeit von Flo11 für Florbildung in Hefezellen beobachtet^[175], eine Eigenschaft, die auf stark gesteigerte Hydrophobizität von Flo11 produzierenden Zellen zurückgeführt wird^[18]. Diese Hydrophobizitätssteigerung scheint allerdings ein Effekt der Flo11B-Domäne sein, da gefunden wurde, dass ein verändertes Arrangement der repetitiven Sequenzen in Flo11B die Hydrophobizität stark erhöht^[194] und zu einer stärkeren Florbildung führt^[195].

5.3.1 Vergleich von Flo11A und Σ Flo11A

Die in dieser Arbeit untersuchten Flo11-A-Domänen stammten aus den beiden Laborstämmen *S. cerevisiae* S288c und *S. cerevisiae* Σ 1278b. Während Flo11 in S288c aufgrund einer Mutation in dem Transkriptionsfaktor Flo8 normalerweise nicht produziert wird, dient der Σ 1278b-Stamm explizit der Untersuchung der Regulation von Flo11.

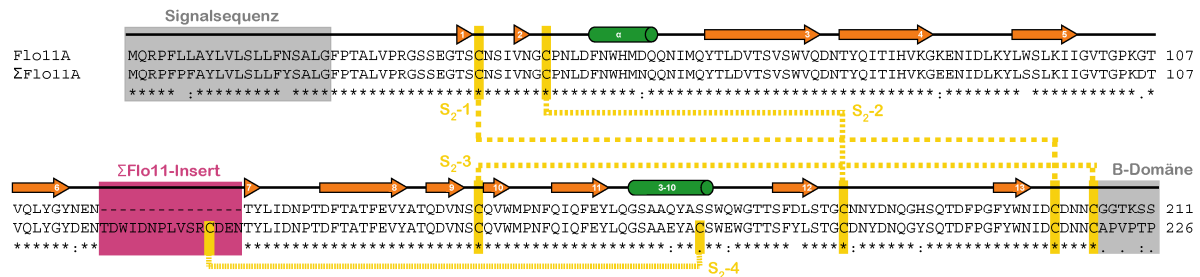


Abb.5.8: Sequenzvergleich von Flo11A und Σ Flo11A. Die Flo11A Sekundärstrukturelemente sind eingezeichnet, die drei in Flo11A vorhandenen Disulfidbrücken sind konserviert (S_2 -1,-2 und -3), eine mögliche vierte Disulfidbrücke zwischen Σ Flo11-Insert und der 3_{10} -Helix ist angegeben (S_2 -4)

In Abbildung 5.8 ist ein Sequenzvergleich zwischen Flo11A aus *S. cerevisiae* S288c und Σ Flo11A aus *S. cerevisiae* Σ 1278b zu sehen. Der maßgebliche Unterschied ist ein *Insert* von 15 Aminosäuren zwischen den β -Strängen 6 und 7. Ein DNA-Sequenzvergleich des Σ Flo11-*Inserts* mit der direkt darauf folgenden Sequenz zeigt, dass dieses *Insert* das Resultat einer Duplikation auf DNA-Ebene ist, bei der 45 Basen verdoppelt wurden.

Σ Flo11-Insert	CGACGAAAATACCGATTGGATTGACAACCCACTTG-TTTCCTG-----TTG-----
Σ Flo11	CGACGAAAATACCTATTGTGATTGACAACCCAACCTGATTTACAGCCACTTTTGAAGTCTA
	***** **

Die Cysteine, die Disulfidbrücken in Flo11A bilden, sind in Σ Flo11A konserviert und mit hoher Wahrscheinlichkeit auch als Disulfide ausgebildet (In Abbildung 5.8 die Disulfidbrücken S_2 -1, -2 und -3). Die beiden zusätzlichen Cysteine innerhalb des Σ Flo11A-*Inserts* und der 3-10-Helix liegen in einem Homologiemodell, das auf Basis von Flo11A berechnet wurde, in enger Nachbarschaft (Abbildung. 5.9).

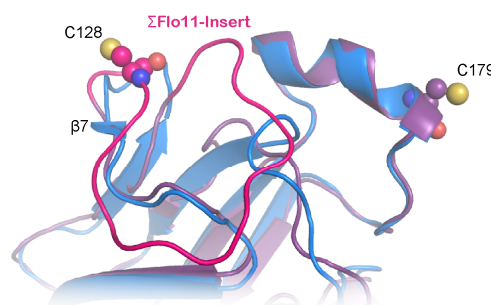


Abb.5.9: Überlagerung der Flo11A-Struktur (blau) und des mit Hilfe von I-Tasser^[196] berechneten Σ Flo11A-Homologiemodells (violett). Das Σ Flo11-Insert ist in Magenta dargestellt. Die zwei in der Σ Flo11A-Sequenz zusätzlich vorhandenen Cysteine sind als Sphären dargestellt.

Vermutlich wird in der tatsächlichen Struktur von Σ Flo11A der sehr kurze β -Strang 7 nicht mit dem β -Faltblatt 3 interagieren, sondern sich der gesamte $\beta 6$ - $\beta 8$ -loop auf eine Art arrangieren, die eine Disulfidbindung zwischen C128 und C178 erlaubt. Diese Vermutung wird durch bioinformatische Analyse der Cysteine gestützt, die von unabhängigen

Im Phylogramm treten vier verschiedene Flo11-Domänen-Gruppen auf, wobei drei dieser Gruppen sich aus Flo11-Domänen aus verschiedenen *S. cerevisiae* Stämmen wie Lalvin EC1118 (kommerzielle Champagner-Hefe, Lallemend, Kanada), VIN13 (kommerzielle Weinhefe, Anchor Yeast, Südafrika) oder FostersB und FostersO, (kommerzielle Bierhefen, Foster's, Australien) und natürlich den Laborstämmen S288c und Σ 1278B zusammensetzen. Die vierte Gruppe besteht aus Flo11-Domänen aus verschiedenen Hefen, wie *Pichia pastoris*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Kluyveromyces lactis*, *Zygosaccharomyces rouxii*, *Debaryomyces hansenii* und anderen weiter von *S. cerevisiae* entfernten Ascomyceten. Zwei weitere Flo11-Domänen ließen sich nicht eindeutig einer Gruppe zuordnen. Interessanterweise liegen Flo11A und Σ Flo11A in der gleichen phylogenetischen Gruppe, sind also auch innerhalb der Flo11-Domänen sehr nahe miteinander verwandt. Zusammen mit den sehr ähnlichen Ergebnissen der CD-Spektroskopie (4.7.6) für diese beiden Flokkulindomänen und der Tatsache, dass unter allen 42 Flo11-Domänen nur bei zwei nahe Verwandten von Flo11A und Σ Flo11A (FostersO, E7NPK4 und YJM789, A6ZVT8) ein Σ Flo11-Insert vorliegt, kann davon ausgegangen werden, dass Flo11A und Σ Flo11A sich in ihrer Struktur und Funktion weitgehend entsprechen. Dies wird auch durch *in vivo* Untersuchungen bestätigt, die für Flo11 und Σ Flo11 ähnliche Phänotypen zeigen^[25, 82].

5.3.3 Grenzen der Flo11A-Domäne

Ein Sequenzvergleich der Flo11A-Domänen aus Flo11 Gruppe 1 (Abb. 5.11) zeigt eine sehr hohe Ähnlichkeit der Flo11A-Domänen, die ab C205 (Flo11A_S288c) schlagartig abbricht. Somit markiert dieses Cystein das Ende der Flo11A Domäne, es folgt die Serin- und Threonin-reiche B-Domäne. Auch in der Flo11A-Kristallstruktur konnte bis zu dieser Aminosäure sehr gut definierte Elektronendichte beobachtet werden, während schon das folgende Glycin nur noch schwach definiert war. Die folgenden 5 Aminosäuren konnten, obwohl im Flo11A-Konstrukt enthalten, keiner Elektronendichte mehr zugeordnet werden, waren also vollständig fehlgeordnet.

	Flo11A-Domäne	Flo11B-Domäne
Flo11 _P08640	WQWGTTSFDLSTGCNNYDNQGHSTQDFPGFYWNIDCDNCCGGTKSSTTTT-STSESSTTT	224
_Q6LCS8	WQWGTTSFDLSTGCNNYDNQGHSTQDFPGFYWNIDCDNCCGGTKSSTTTT-STSESSTTT	224
_E7KDY4	WQWGTTSFDLSTGCNNYDNQGHSTQDFPGFYWNIDCDNCCGGTKSSTTTT-STSESSTTT	173
_B5VKV5	WQWGTTSFDLSTGCNNYDNQGHSTQDFPGFYWNIDCDNCCGGTKSSTTTT-STSESSTTT	225
_C8ZAR8	WQWGTTSFNLSTGCNNYDNQGHSTQDFPGFYWNIDYDNNCGGTSSTTTT-STSES---	221
_B3LTJ0	WQWGTTSFNLSTGCNNYDNQGHSTQDFPGFYWNIDYDNNCGGTSSTTTT-STSESSTTT	225
_E9P8M0	WQWGTTSFYLLSTGCNNYDNQGHSTQDFPGFYWNIDWDNNCGGTSSTTTT-STSESSTTT	225
Σ Flo11 _E9P9G2	WEWGTTSFYLLSTGCNNYDNQGHSTQDFPGFYWNIDCDNNCAPVP---TPSSSTTESS---	234
_A6ZVT8	WEWGTTSFYLLSTGCNNYDNQGHSTQDFPGFYWNIDCDNNCAPVP---TPSSSTTESS---	234
_E7NPK4	WEWGTTSFYLLSTGCNNYDNQGHSTQDFPGFYWNIDCDNNCC-----SSTNSI---	227
	*:***** *:*****:*****:*****:***** *	*::*

Abb.5.11: Sequenzvergleich der phylogenetischen Gruppe 1, Flo11 und Σ Flo11 sind hervorgehoben, für die anderen Flokkuline ist die UniProt-ID angegeben. C207 (Flo11) markiert das Ende der Flo11A-Domäne.

5.3.4 Flo11A bindet keine Glycane

Die Struktur von Flo11A, die in dieser Arbeit aufgeklärt wurde, zeigt, entgegen früherer Vermutungen, wonach Flo11 ein entfernt verwandtes Protein des Flo1-Typs sein könnte^[48, 49] eine vollständig andere, neuartige Faltung, die in keinem Verwandtschaftsverhältnis zu anderen Flokkulinen steht. Die Struktur zeigt keine offensichtliche Bindungstasche für Kohlenhydrate oder eine stark saure Stelle, in der die Bindung eines Calciumions denkbar wäre. Bei Hochdurchsatz-Glycan-Screenings in Zusammenarbeit mit dem *Consortium for Functional Glycomics* konnte bei verschiedenen Flo11A und Σ Flo11A-Varianten ebenso wenig eine Kohlenhydratbindung nachgewiesen werden wie durch Fluoreszenzspektroskopie. Auch wurden in verschiedenen *Soaking*-Experimenten weder Calciumionen noch Kohlenhydrate in der Flo11A Struktur gefunden. Aufgrund dieses Befundes erscheint ein lektinartiger Mechanismus für die Bindung von Flo11A an andere Hefezellen oder Substrate unwahrscheinlich. Verschiedene Sequenzvergleiche, die das Tryptophan 168 mit dem Tryptophan 228 aus Flo5, welches peripher in die Mannosebindung involviert ist, in Verbindung bringen^[49, 86], bilden offensichtlich nicht die Realität ab, da in der Nähe dieses Tryptophanrestes in Flo11A keine Kohlenhydratbindungsstelle gefunden werden konnte.

Die einzige Beobachtung die für einen lektinartigen Mechanismus von Flo11A spricht, ist die calciumabhängige und mannoseempfindliche Flo11-abhängige Flokkulation von *Saccharomyces diastaticus*^[48, 49, 80]. Soweit ersichtlich wurde bei den genannten Arbeiten die Adhäsion von Flo11-tragenden Zellen^[48, 49] oder synthetischen *Beads*^[80] an *S. diastaticus* getestet. Obwohl durch eine Protein-Blast-Suche^[202] kein Flo1-Typ Flokkulin in dieser Hefe gefunden wird, kann ein Sequenzierungsfehler, besonders in den subtelomeren Bereichen, in denen die Gene der Flo1-Typ Flokkuline vorkommen, nicht vollständig ausgeschlossen werden. Da in den genannten Arbeiten immer vollständig posttranslational modifiziertes und somit hypermannosyliertes Flo11 zum Einsatz kam, ist möglicherweise ein im Wildtyp von *S. diastaticus* nicht entdecktes Flo1-Typ Flokkulin für die beobachtete Flokkulation verantwortlich. Die nicht auftretende Flokkulation bei Flo11-Deletionsstämmen könnte an für dieses hypothetische Flokkulin nicht mehr ausreichenden Mannoseeinheiten auf der Zelloberfläche liegen.

5.3.5 Modell für eine homotypische Flo11A-Flo11A-Interaktion

Flo11A zeigt eine Struktur bestehend aus 3 β -Faltblättern, beziehungsweise 13 β -Strängen. Die N- und C-Termini liegen, ähnlich wie bei der Flo5A und der Epa1A-Struktur, auf einer Seite des Proteins, so dass die den Termini gegenüberliegende Seite, die von einer 3_{10} -Helix

überdacht wird, maximal von der Zelloberfläche entfernt steht. Es konnte keine Bindungstasche für Kohlenhydrate oder andere Liganden auf der Flo11A-Oberfläche ausgemacht werden. Auffällig ist aber eine hohe Anzahl an Solvens-exponierten Aromaten, genauer sieben Tryptophanen und zehn Tyrosinen, die sowohl an der Termini-Seite, als auch an der gegenüberliegenden Seite, der 3_{10} -Seite gefunden wurde (Abbildung 5.12). Darauf basierend wird ein homotypisches Interaktionsmodell der Flo11A Domäne vorgeschlagen, bei der eine Bindung vieler Flo11A-Domänen über aromatische Bänder zu Stande kommt.

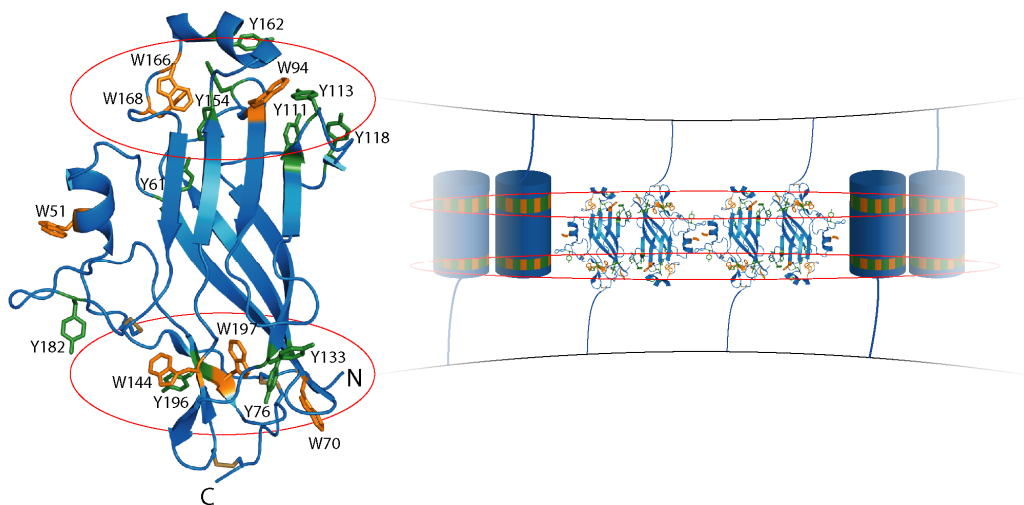


Abb.5.12: Vorgeschlagenes Interaktionsmodell für die Flo11A Domäne. Tryptophane sind in oranger Farbe gezeigt, Tyrosine in grüner Farbe. Der Großteil der aromatischen Aminosäuren liegt in zwei Bändern an der Termini-Seite und an der 3_{10} -Seite vor; diese sind rot markiert. In der schematischen Darstellung ist die vorgeschlagene Interaktion der Flo11A Domänen über aromatische Bänder gezeigt, bei der die 3_{10} -Bänder der einen Hefezelle mit den Termini-Bändern der anderen Hefezelle interagieren und *vice versa*.

Die bindende Kraft würde somit durch π -Stacking oder einen hydrophoben Effekt zwischen den aromatischen Bändern von Flo11 Domänen zu Stande kommen. In der Kristallpackung von Flo11A konnten ähnliche Interaktionen beobachtet werden (Abbildung 5.13).

Dass nicht exakt der vorgeschlagene Interaktionsmodus gefunden wurde, ist aufgrund der weiteren Kristallkontakte und der vermuteten schwachen Wechselwirkung der einzelnen Flo11A Domänen nicht überraschend. Eine Interaktion der Flo11A-Domänen untereinander würde ebenso wie bei Flo5A-Domänen stärker auf der Avidität vieler Flokkuline beruhen, als auf der Affinität einzelner.

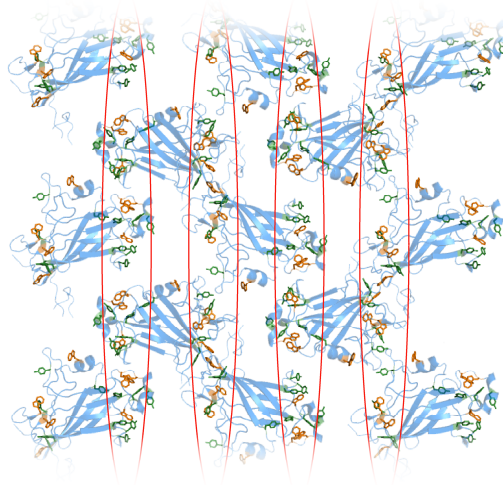


Abb.5.13: In der Kristallpackung von Flo11A kann eine Interaktion der aromatischen Bänder miteinander beobachtet werden. Vermutlich aufgrund weiterer Kristallkontakte interagieren jeweils die Bänder auf der 3₁₀-Seite und die Bänder auf der Termini-Seite miteinander. Tryptophane sind orange, Tyrosine grün dargestellt.

Mit diesem Bindungsmodell kompatibel sind Beobachtungen, die eine homotypische Interaktion von Flo11 produzierenden Hefezellen in Kolonien zeigen (Abbildung 5.14)^[203].

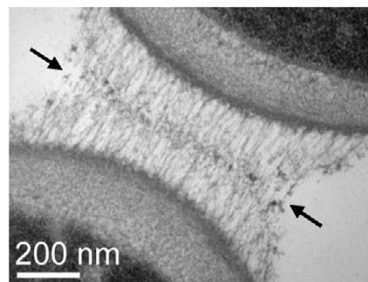


Abb.5.14: Elektronenmikroskopisches Bild der Interaktion von Flo11 auf der Oberfläche von Hefen^[203]. Die mit Pfeilen markierte Stelle zeigt die Position der Flo11A-Domäne, die Länge der Fasern ist mit der Länge der Flo11B-Domäne vereinbar.

Die beobachteten Fasern scheinen von beiden interagierenden Hefezellen auszugehen; die Länge der Fasern ist mit der Länge der Flo11B-Domäne vereinbar. Diese Fasern verbinden auch ovale Zellen an der Oberfläche von Kolonien mit pseudohyphalen Zellen im Koloniefundament, so dass pseudohyphales Wachstum auf diese Fasern angewiesen sein könnte. Derselbe Versuch mit einem Flo11-Deletionsstamm zeigt keine entsprechenden Wechselwirkungen zwischen den Zellen. Eine homotypische Interaktion von Flo11A-Domänen wurde auch qualitativ durch Oberflächen-Plasmon-Resonanz nachgewiesen^[86].

5.3.6 Hydrophobizität als Interaktionsmechanismus von Flo11A

Da eine gesteigerte Hydrophobizität von Hefezellen, die Flo11 produzieren, festgestellt wurde, gibt es Vorschläge, die die homotypische Interaktion zwischen Flo11A-Domänen auf

hydrophoben Wechselwirkungen zurückführen^[46, 86, 204]. Daher wurde die Hydrophobizität der Flo11A Domäne näher untersucht.

Der GRAVY (*Grand Average of Hydropathicity*)-Index, der die Hydrophobizität von Proteinen auf Basis ihrer Aminosäuresequenz angibt^[205], liegt für Flo11A bei einem Wert von -0.491, für Σ Flo11A bei einem Wert von -0.466. Damit liegen beide Flokkulin-Domänen in einem Bereich von -1 bis 0, der für lösliche, nicht stark hydrophobe Proteine üblich ist. Um auch die Verteilung hydrophober Reste auf der Proteinoberfläche in die Betrachtung mit einzubeziehen, wurde mit dem Programm VASCo^[165] eine Darstellung erzeugt, in der für jeden Oberflächenpunkt der Hydrophobizitätsbeitrag der benachbarten Atome berechnet und in einer entsprechenden Farbe aufgetragen wird. In Abbildung 5.15 ist die Oberfläche von Flo11A entsprechend ihrer Hydrophobizität eingefärbt. Abgesehen von einem Bereich um die Tyrosine Y113 und Y118 sind nur wenige stärker hydrophobe Bereiche sichtbar. Da der größte Teil der Flo11A-Oberfläche weder besonders hydrophob noch ausgesprochen hydrophil ist, scheint eine hydrophobe Wechselwirkung von Flo11A mit einem Substrat aufgrund der oberflächenexponierten Aminosäuregruppen unwahrscheinlich.

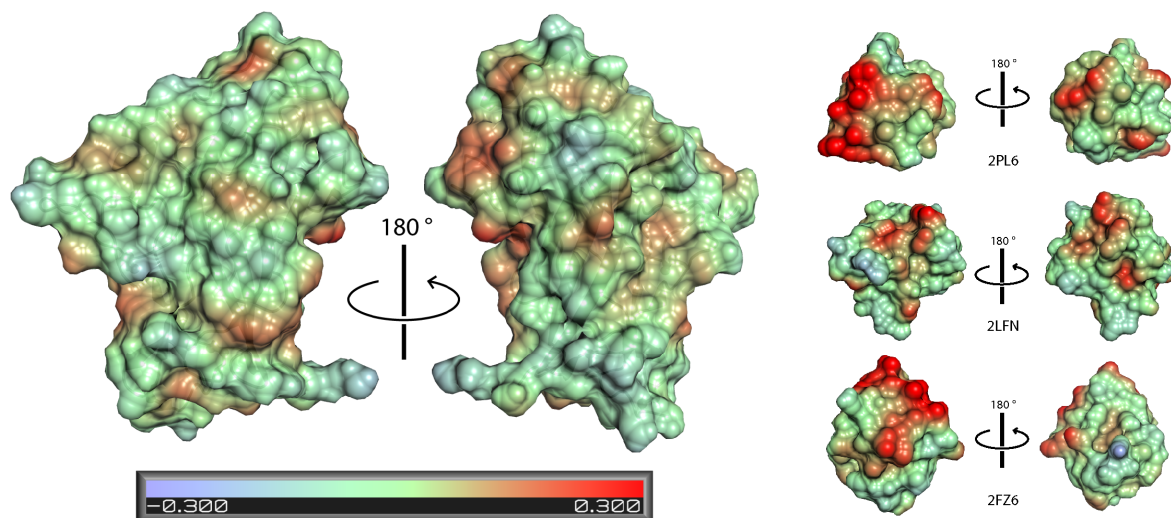


Abb.5.15: Hydrophobe Bereiche auf der Oberfläche von Flo11A. Die Berechnung wurde mit VASCo^[165] durchgeführt. Die Farben sind von blau, -0.3, polar bis rot, 0.3, hydrophob aufgetragen. Die auf der rechten Seite dargestellten Strukturen sind Hydrophobine aus *Hypocrea jecorina* (2PL6, 2FZ6) und aus *Neurospora crassa* (2LFN), deren Oberflächenhydrophobizität ebenso berechnet und dargestellt wurde, wie die von Flo11A.

In Abbildung 5.15 sind die weiteren drei Hydrophobine mit ihren nach Hydrophobizität eingefärbten Oberflächen gezeigt. Diese Proteine, die auch als biologische Detergenzien gelten können, vermitteln zwischen polaren und unpolaren biologischen Oberflächen. Es ist ersichtlich, dass sie teilweise extrem hydrophobe Oberflächenbereiche zeigen und an anderer Stelle eher polar sind. Flo11A dagegen zeigt auch an den unpolarsten Stellen eine deutlich

geringere Hydrophobizität als die Hydrophobine. Daher ist auch eine Hydrophobin-ähnliche Verhaltensweise von Flo11A aufgrund der geringen Oberflächenhydrophobizität unwahrscheinlich.

5.3.7 Ausblick

Die vollständige Wirkungsweise von Flo11 erscheint noch nicht geklärt, vermutlich birgt Flo11 aber mehrere Aktivitäten, die auf A- und B-Domänen verteilt sein können. Es scheint eine homotypische Interaktion zu bestehen, die über die Flo11A-Domäne vermittelt wird und zu pseudohyphalem Wachstum und damit einhergehend zu invasivem Wachstum in Agar führt. Dies könnte überprüft werden, indem ein Großteil der aromatischen Aminosäuren in den aromatischen Bändern durch Punktmutationen in nicht aromatische Aminosäuren variiert wird. Es würde eine Schwächung oder Aufhebung der Phänotypen erwartet, die der Flo11A-Domäne zugeschrieben werden. Die hydrophoben Eigenschaften, die zur Bildung von Matten und Bindung an Kunststoffe notwendig sind, sind möglicherweise auf die hochglykosylierte B-Domäne zurückzuführen. Dies könnte auch erklären, wie Flo10 in der Lage ist, in einer Flo11-Deletionsvariante einige Phänotypen von Flo11 zu zeigen^[26, 51], nämlich nicht durch Ersatz der Flo11A-Aktivität durch Flo10A, sondern der Flo11B-Aktivität durch Flo10B. Flo10B unterscheidet sich von den B-Domänen der Flokkuline Flo1, Flo5 und Flo9 durch das Fehlen der Flo-Repeats (PF00624) und ähnelt mit seinen kurzen, nur in Flo10B vorkommenden Repeats der B-Domäne von Flo11^[29]. Um diese Hypothesen zu überprüfen, wären Untersuchungen an den B-Domänen der verschiedenen Flokkuline notwendig.

5.4 Struktur und Funktion von Sun4 aus *S. cerevisiae*

Sun4 aus *S. cerevisiae* wurde als Glucanase beschrieben, die in die Zell-Septierung involviert ist. Hefezellen der Deletionsvariante *sun4Δ* werden größer als der Wildtyp und trennen sich nach der Knospung nicht vollständig von der Mutterzelle^[88]. Für ein Homolog von Sun4 aus *Candida albicans*, Sun41, mit 57% Sequenzidentität wurden ähnliche Phänotypen beschrieben^[95]. Da *sun4Δ* und *sun41Δ* Stämme eine höhere Resistenz gegen β -1,3-Glucanasen zeigen^[88, 95], wird davon ausgegangen, dass auch ihre native Funktion in der Zellwand die Spaltung von β -1,3-glycosidischen Bindungen ist. Bereits als Sun4 entdeckt wurde, wurde die Ähnlichkeit zu einer β -Glucanase aus *Candida wickerhamii* erkannt^[89].

5.4.1 Vergleich mit anderen Sun-Domänen enthaltenden Proteinen

In der aktuellen *protein families database* PFAM 26.0^[61] befinden sich 208 Sequenzen von SUN-Domänen, von denen sich 207 den Ascomyceten und davon 101 den Saccharomyceten

zuordnen lassen. Damit ist diese Domäne, die sich immer am C-terminus eines Proteins befindet, in diesen Pilzen ubiquitär, kommt aber praktisch in keiner anderen Domäne des Lebens vor. In allen 208 gefundenen Sequenzen sind 10 Cysteine konserviert, die in Sun4 fünf Disulfidbrücken ausgebildet haben. Dies deutet auf eine sehr hohe strukturelle Konservierung der SUN-Domäne hin, da diese Disulfidbrücken vermutlich in allen SUN-Domänen ausgebildet sind.

Allein in *Saccharomyces cerevisiae* existieren neben Sun4 drei weitere Proteine, die eine SUN-Domäne enthalten, Sim1 (85% Identität zu Sun4), Uth1 (64%) und Nca3 (64%). Während Nca3 ein mitochondriales Protein ist, das an der Synthese eines Teils der F-typ ATPase beteiligt sein soll^[206], ist Uth1 in die Alterung und den Abbau von Mitochondrien involviert^[92]. Die Proteine Sim1 und Sun4 liegen in der Zellwand von *S. cerevisiae* vor. Neuere Untersuchungen fanden allerdings auch einen Teil von Sun4 in den Mitochondrien, sowie Uth1 in der Zellwand lokalisiert^[93]. Da eine Doppeldeletion von Sun4 und Uth1 zu einer weiteren Verschlechterung der Septum-Bildung beim Knospen einer Hefezelle führt, ein Phänotyp, der ursprünglich nur einer Sun4-Deletion zugeschrieben wurde, ist es möglich, dass die SUN-Domänen-Proteine zum Teil in der Lage sind, die Aufgabe anderer SUN-Domänenhaltiger Proteine zu übernehmen^[93, 207]. Diese Annahme wird auch durch den Befund gestützt, dass sowohl Uth1 als auch Nca3 ein Signalpeptid für den Zellexport aufweisen und somit starke Hinweise auf ein Vorkommen dieser Proteine in der Zellwand vorliegen.

5.4.2 Die Struktur von Sun4-C

Die Struktur von Sun4-C, also der C-terminalen SUN-Domäne des Proteins Sun4 aus *S. cerevisiae*, zeigt eine Domäne von bisher nicht beobachteter Faltung, gepackt an eine Thaumatin-ähnliche Domäne. Zwischen diesen beiden Domänen, deren Übergang der *loop* $\beta 9$ - $\beta 10$ bildet, liegt eine in allen SUN4-Domänen hoch konservierte Region (Abbildung 5.16).

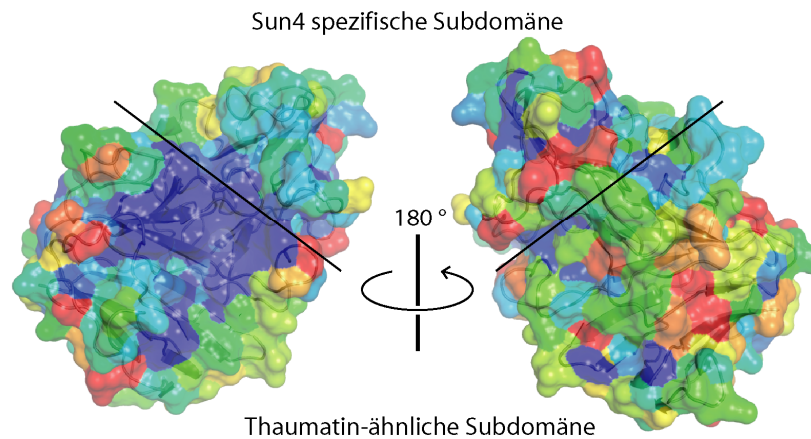


Abb.5.16: Oberfläche von SUN4, die Aminosäuren wurden nach ihrer Konservierung eingefärbt, wobei rote Farbe nicht konservierte Aminosäuren und blau stark konservierte Reste anzeigt. Die Berechnung erfolgte durch den ConSurf-Server^[208] aus 65 SUN-Domänen.

Ein derartiges Strukturmotiv ist eines der drei für die aktive Tasche von Glycosylhydrolasen beschrieben. Es kommt besonders häufig bei Glycosylhydrolasen mit polymeren Substraten, wie Chitinasen, Endocellulasen, α -Amylasen, β -1,3-1,4-Glucanasen oder β -1,3-Glucanasen vor^[209]. Eine genauere Betrachtung der konservierten Spalte von Sun4-C zeigt einige potentiell für die Bindung von Kohlenhydraten als auch für die hydrolytische Spaltung notwendigen Aminosäuren (Abbildung 5.17).

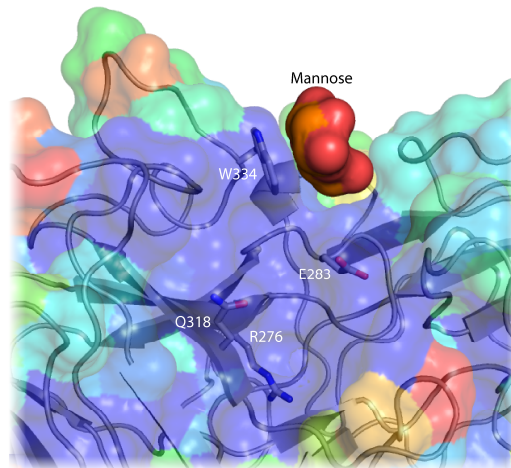


Abb.5.17: Oberflächenrepräsentation von Mannose in der konservierten Spalte von SUN4. Die hydrophobe Seite der Mannose interagiert mit Tryptophan 334 während die 6-OH-Gruppe eine Wasserstoffbrückenbindung mit Threonin 200 ausbildet. Die reduzierende Gruppe der Mannose weist in Richtung der konservierten Spalte, so dass ein längeres Oligosaccharid mit einer terminalen Mannose in diesen Spalt passen könnte. Weiterhin sind in dem konservierten Spalt die potentiell katalytisch aktiven Aminosäuren R276, E283 und Q 318 angezeigt.

Es konnte gezeigt werden, dass die konservierte Spalte von SUN4-C mit einer Kohlenhydratbindung kompatibel ist, indem die Bindung von Mannose bei hohen Konzentrationen an einer Seite der Spalte durch *Soaking*-Experimente nachgewiesen wurde.

Der Mannose-koordinierende Rest, das Solvens-exponierte Tryptophan 334, ist in allen SUN-Domänen konserviert, ebenso einige andere aromatische Aminosäuren, wie Y320 und W310, das nur in einem Fall gegen ein Phenylalanin ausgetauscht ist. Die hohe Zahl von Solvens-exponierten Aromaten in der konservierten Spalte, deutet darauf hin, dass in diesem Bereich weitere Kohlenhydratuntereinheiten gebunden werden können^[210, 211].

5.4.3 Ein möglicher Glucanase-Mechanismus für Sun4

In der konservierten Spalte sind ebenfalls einige potentiell katalytisch aktiven Aminosäuren vorhanden. Glutamat 283 ist zu 100% in allen SUN-Domänen konserviert und könnte für eine hydrolytische Spaltung von Glycosiden notwendig sein, deren Mechanismus auf einer sauren Gruppe beruht, die den Sauerstoff der glycosidischen Bindung protoniert während eine basische Aminosäure den 1-Kohlenstoff des Zuckers koordiniert und so die glycosidische Bindung bricht^[209, 212] (Abbildung 5.18).

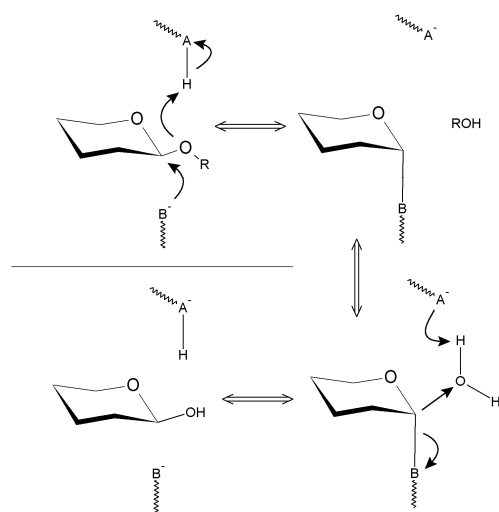


Abb.5.18: Mechanismus der Säure-Base-katalysierten Glycosid-Spaltung

Die Rolle der basischen Aminosäure nimmt dabei das Glutamin 318 ein. Dieses ist zwar nur zu 65% in den SUN-Domänen konserviert, allerdings befindet sich in den verbleibenden 35% ein Histidin an dieser Stelle, das ebenfalls zur basischen Katalyse in der Lage ist. Für den postulierten Mechanismus ist ein Abstand der sauren und der basischen Aminosäuregruppe von 5.5 Å optimal^[209]. Dieser liegt in der Sun4-C Struktur mit 7 Å zwischen E283 und Q318 zwar leicht höher, dürfte allerdings durch Konformationsänderungen bei gebundenem Glycosid erreicht werden.

Eine alternative Möglichkeit wäre eine direkte Reaktion des 1-Kohlenstoff mit einem Wassermolekül, das über eine basische Gruppe aktiviert wurde. Hierfür kommt das Arginin 276 in Frage, das zu 58% in der SUN4-Domäne konserviert ist. Auch das alternativ an dieser Stelle vorkommende Glutamin wäre zu einer solchen Reaktion in der Lage. Ein idealer Abstand zwischen den reaktiven Gruppen liegt für eine solche Reaktion bei 10 Å, in der Sun4-C Struktur wurden 12.3 Å gefunden. Somit erscheinen beide Hydrolysewege möglich.

Die Struktur von Sun4-C bestärkt die Vermutungen, dass es sich bei Sun4 um eine β -Glucanase handeln könnte. Durch die ungewöhnlich starke Konservierung der aktiven

Reste, lässt sich vermuten, dass ein Großteil der 208 bisher bekannten SUN-Domänen Proteine eine Glucanaseaktivität aufweisen wird.

5.4.4 Ausblick

Um die Glucan-Spezifität von Sun4 zu bestimmen, bietet sich sowohl das Hochdurchsatz-*Screening* des CFG an, als auch Cokristallisationen oder fluoreszenzspektroskopische Messungen mit β -1,3-verknüpften Glucanen, die ein Hauptbestandteil der Hefezellwand sind. Allerdings wäre es ratsam eine Variante von Sun4 für diese Experimente zu verwenden, bei der das Glutamat Q283 gegen einen neutralen oder basischen Rest ausgetauscht ist, um eine Hydrolyse des zu analysierenden Kohlenhydrats zu verhindern.

5.5 Bildung eines Gadolinium-Oxo-Clusters in einer sauren Tasche der Flo5A-Oberfläche

Die Entdeckung des Gadolinium-Oxo-Clusters während der Phasierung der Flo5A-Struktur war nicht erwartet worden. Lanthanide als Phasierungsmittel für calciumbindende Proteine wurden schon früher eingesetzt^[213, 214], eine Clusterbildung wurde aber bisher noch nicht beschrieben. Während der Cluster zum einen dazu beitrug, die Flo5A-Struktur zu phasieren, war es durch hochauflösende Strukturen möglich, auch die verbrückenden Oxo-Liganden der Gadolinium-Ionen strukturell aufzuklären und somit die auf der Flo5A-Oberfläche gefundenen Strukturen Gadolinium-Oxo-Clustern zuzuordnen, die zuvor schon in Kleinmolekülstrukturen gefundenen worden waren.

5.5.1 Zwei verschiedene Formen der Gadoliniuminkorporation in Flo5A

Bei der Untersuchung der Clusterbildung auf der Flo5A-Oberfläche mit Hilfe von 42 Datensätzen verschiedener Flo5A/Gd-Kristalle wurde deutlich, dass zwei Modi für eine Gadoliniuminkorporation in die saure Tasche, die von den Aspartaten D78, D82, D125 und D245 auf der Flo5A-Oberfläche aufgespannt werden, beobachtet werden können. Zum einen kann die Clusterbildung aus sieben miteinander über Oxo-Liganden verbrückte Gadoliniumionen erfolgen (Abb. 5.19, Route A) oder es kann eine Bindung von drei nicht miteinander verknüpften Gadoliniumionen an derselben Stelle geben (Abb. 5.19, Route B). Die genauen Umstände unter denen eine der beiden Routen eingeschlagen wird, konnten nicht vollständig aufgeklärt werden. Es scheint allerdings wichtig, dass eine ausreichende Gadoliniumkonzentration (>50 mM) zur Verfügung steht, so dass die Position Gd5 besetzt werden kann, bevor Position Gd4 besetzt wird. Ansonsten kommt es zu einer Koordination von Gd3 und Gd4 durch D125, die zu einer leichten Verschiebung der Position von Gd3 führt

und somit die weitere heptanukleare Clusterbildung inhibiert. Im Cluster ist Gd4 daher folgerichtig auch nur minimal besetzt (siehe Abbildung 4.22).

Die Tatsache, dass in der trinuklearen Form alle Gadolinium-Ionen mit neun Oxo-Liganden abgesättigt sind, während bei der heptanuklearen Form jedes Gadoliniumion zwischen sieben und neun Oxo-Liganden koordiniert, erklärt, dass die offenbar thermodynamisch stabilere trinukleare Form in 70% der untersuchten Datensätze aufgetreten ist.

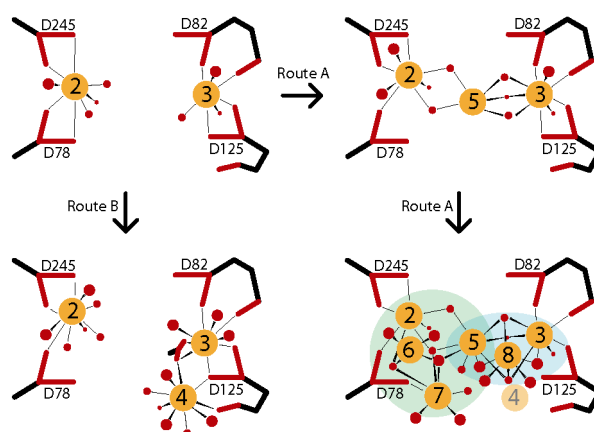


Abb.5.19: Modell der Assemblierung des heptanuklearen Gadolinium-Clusters. Route A führt zur Bildung eines heptanuklearen Clusters mit schwach besetzter Gd4-Position, Route B führt zu einer trinuklearen Inkorporation von Gadolinium, mit einem verbrückenden Acetation zwischen Gd3 und Gd4. In dieser Form sind neun Oxo-Liganden an jedem Gadolinium koordiniert und diese somit gesättigt.

5.5.2 Zuordnung der Flo5A Gadoliniumcluster zu Kleinmolekülclustern

Wird der heptanukleare Cluster genauer analysiert, zeigt sich, dass er aus drei Sub-Clustern aufgebaut ist. Zum einen gibt es den Subcluster A (Abb. 5.20, A), der einem $[\text{Gd}_4(\mu_3\text{-OH})_4]^{8+}$ -Kuban entspricht und von den Gadoliniumionen in den Positionen Gd2, Gd5, Gd6 und Gd7 aufgespannt wird, zum anderen zwei trinukleare Subcluster B1 (Abb. 5.20, B) und B2 des Typs $[\text{Gd}_3(\mu_3\text{-OH})_2(\mu_2\text{-OH})_3]^{4+}$, die von den Gd Positionen Gd3, Gd5 und Gd8, respektive Gd3, Gd4 und Gd5 aufgespannt werden. Der Subcluster B2 ist dabei durch die geringe Besetzung der Gd4-Position nicht vollständig ausgebildet und verzerrt. Alle Subcluster sind durch die Position Gd5 verbunden und bilden so den Gd₇-Supercluster.

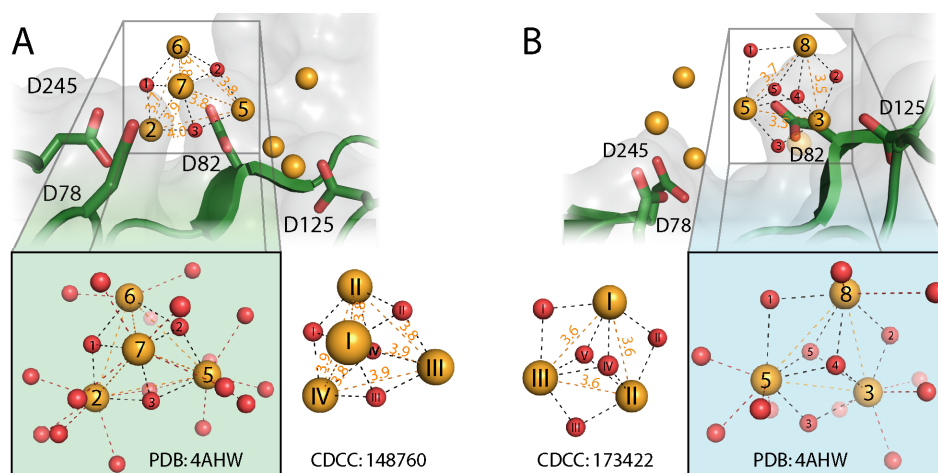


Abb.5.20: Detailansichten des heptanuklearen Gadolinium-Oxo-Clusters und seiner Äquivalente in Kleinmolekülstrukturen. **A** Ein Gd_4O_4 -Typ Subcluster mit drei verbrückenden Oxo-Liganden. In der Hervorhebung sind alle von den Gadoliniumionen koordinierten Oxo-Liganden gezeigt. Die benachbarte Struktur (CDCC 148760) zeigt einen Kleinmolekülcluster gleichen Typs, der mit L-Valin co-assembliert wurde^[215]. **B** Ein trinukleärer Gadolinium-Cluster vom Typ Gd_3O_5 verbunden mit dem Gd_4O_4 Subcluster über das Gadoliniumion an Position Gd5. Die Hervorhebung zeigt wiederum alle koordinierten Oxo-Liganden, eine Kleinmolekülstruktur, die mit Orthovanillin co-assembliert wurde, ist daneben gezeigt (CDCC 173422)^[216]. Alle Distanzen sind in Ångström angegeben.

Zurzeit (April 2012) finden sich in der *Cambridge Structural Database* (CSD) neun Kristallstrukturen die ein $[\text{Gd}_4(\mu_3\text{-OH})_4]^{8+}$ -Kuban enthalten und sieben Kristallstrukturen, die einen $[\text{Gd}_3(\mu_3\text{-OH})_2(\mu_2\text{-OH})_3]^{4+}$ -Cluster enthalten. Die in den Kuban-Strukturen gefundenen Inter-Gadolinium-Abstände liegen zwischen 3.8 und 3.9 Å, und entsprechen somit sehr gut dem auf der Flo5A-Oberfläche gefundenen Subcluster A, der Inter-Gadolinium Abstände von 3.7 bis 4.0 Å aufweist. Folgerichtig weist Subcluster A, zusammen mit den verbrückenden Oxo-Liganden 1,2 und 3 im Vergleich mit einem synthetischen Gd_4O_4 -Cluster^[215] auch nur einen rmsd von 0.18 Å auf. Allerdings führt eine Verzerrung, hervorgerufen durch eine Koordination eines verbrückenden Oxo-Liganden an D82 dazu, dass zwischen Gd2, Gd5 und Gd6 keine μ_3 -Brücke sondern nur eine μ_2 -Brücke entstehen kann. Der trinukleare Subcluster B1 zeigt im Vergleich mit einer Kleinmolekülstruktur^[216] einen rmsd von 0.22 Å und ist somit ebenfalls in guter Übereinstimmung mit synthetischen Gadolinium-Oxo-Clustern, während der verzerrte Subcluster B2 einen rmsd von 0.59 Å aufweist.

Mit Hilfe der PDBe-Motiv-Suche^[217] konnten vier weitere Lanthanid-Cluster auf Proteinoberflächen gefunden werden. Die Kristallstruktur von Pvs25 aus *Plasmodium vivax*^[218] (PDB: 1Z1Y) enthält einen tetraedrischen Ytterbium-Cluster, der zwischen fünf symmetrieäquivalenten Monomeren gebunden ist, Ein weiterer tetraedrischer Ytterbium-Cluster wurde im Dimer-Interface des menschlichen Blutgerinnungsfaktors XIII gefunden

(1GGY). Ein trinuklearer Gadolinium-Cluster fand sich innerhalb der Mannosyl-3-Phosphoglycerat Phosphatase aus *Thermus thermophilus* (3ZTY)^[219] und ein trinuklearer Lutetium-Cluster zwischen Symmetrieäquivalenten der Phosphoinositid-3-Kinase aus *Sus scrofa* (1E8X)^[220]. In diesen Strukturen werden keine verbrückenden Oxo-Liganden gefunden, ihre Auflösung ist zu gering um Bindung oder Aufbau der Lanthanid-Cluster zu analysieren, obwohl die Inter-Metall-Abstände von 3.2 bis 4.1 Å auf eine Clusterbildung hindeuten.

5.5.3 Ausblick auf die biomedizinische Relevanz des Gd-Oxo-Clusters

Der beobachtete heptanukleare Supercluster ist der erste beschriebene heterotypische Lanthanid-Supercluster auf einer Proteinoberfläche. Auch in Kleinmolekülen sind Supercluster bisher selten und ausschließlich homotypisch beobachtet worden (Gd₄O₄-Kubane: CSD 190846, Gd₃O₅-Bipyramiden: CSD 158363, 54500, 244786, 737719). Der Aufbau des Clusters erfolgt schrittweise, wie durch *Soaking*-Experimente nachgewiesen werden konnte (siehe Abbildung 4.22). Mit diesen Erkenntnissen ist ein Grundstein gelegt für die gezielte Inkorporation von Gadolinium-Clustern in Biomoleküle, wie zum Beispiel des Ferritin-Typs^[221, 222], was ein erster Schritt in Richtung biokompatibler und gewebespezifischer MRT-Kontrastmittel sein könnte^[223].

5.6 Ausblick

Die Zellwand von *S. cerevisiae* und anderer Hefen ist die Interaktionsfläche dieser Organismen mit ihrer Umwelt. Sie enthält eine Vielzahl an Proteinen, die in der Morphogenese, Adhäsion, Pathogenizität oder Antigenizität beteiligt sind und damit als Ziele für fungizide Wirkstoffe in Frage kommen. Das Hefezellwandproteom war in den letzten Jahren immer wieder Ziel verschiedener Analysen^[12, 224-226]. Hierbei wurde sowohl auf die in der äußeren Zellwand gebundenen Glycoproteine, die mit der Zellumgebung interagieren und, wie im Fall von Epa1 oder Flo5, Zell-Zell Interaktionen vermitteln^[227], als auch auf die für den Erhalt und den immer wieder notwendigen Umbau der Zellwand benötigten Chitinasen und Glucanasen eingegangen^[91]. Insbesondere in Pilzen hochkonservierte Proteine und Domänen, die in keinen anderen Lebensformen vorkommen, wie dies bei der SUN-Domäne beziehungsweise der Flo11-Domäne der Fall ist, stellen hochinteressante Forschungsziele sowohl für den einzigartigen Aufbau der pilzlichen Zellwand als auch für deren therapeutische und agrotechnische Beeinflussung dar. Mit den in dieser Arbeit aufgeklärten Strukturen und Funktionen der vegetativen Adhäsine und des die Zellwand erhaltenden Proteins Sun4 ist ein erster Schritt in Richtung der strukturellen Aufklärung des *S. cerevisiae*

Zellwandproteoms getan. Mit Hilfe der in dieser Arbeit entwickelten Methoden, Zugang zu aktiven Domänen von Hefezellwandproteinen in löslicher Form und in ausreichender Menge zu erhalten, wird es möglich sein, auch weitere einzigartige Proteine aus der pilzlichen Zellwand strukturell und funktionell aufzuklären. Hierzu könnten chitinbindende Domänen wie die cysteinreiche CFEM-Domäne, die möglicherweise an der Remodellierung des Chitinanteils der Zellwand beteiligt ist, die ebenfalls cysteinreiche WSC-Domäne, die an der Stressantwort von Hefezellen beteiligt ist oder verschiedene Hydrophobin-artige Proteine, die Interaktionen mit abiotischen Oberflächen oder Pflanzenzellen ermöglichen, gehören. Langfristiges Ziel ist somit ein umfassendes Verständnis der Struktur-Funktion-Beziehung zwischen der pilzlichen Zellwand und ihrer Umwelt auf molekularer Ebene.

6 Literatur

1. Hinnen, A., J.B. Hicks, and G.R. Fink, *Transformation of yeast*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1978. **75**: 1929-33.
2. Goffeau, A., et al., *Life with 6000 Genes*. Science, 1996. **274**: 546-567.
3. Hansen, E.C., *Recherches sur la physiologie et la morphologie des ferments alcooliques: Les ascospores chez le genre Saccharomyces* 1883.
4. Libkind, D., et al., *Microbe domestication and the identification of the wild genetic stock of lager-brewing yeast*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2011. **108**: 14539-44.
5. Nguyen, M.H., et al., *The changing face of candidemia: emergence of non-Candida albicans species and antifungal resistance*. The American journal of medicine, 1996. **100**: 617-23.
6. Sobel, J.D., et al., *Vulvovaginal candidiasis: epidemiologic, diagnostic, and therapeutic considerations*. American journal of obstetrics and gynecology, 1998. **178**: 203-11.
7. Marr, K.A., et al., *Epidemiology and outcome of mould infections in hematopoietic stem cell transplant recipients*. Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America, 2002. **34**: 909-17.
8. Wisplinghoff, H., et al., *Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide surveillance study*. Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America, 2004. **39**: 309-17.
9. Kaur, R., et al., *A yeast by any other name: Candida glabrata and its interaction with the host*. Current opinion in microbiology, 2005. **8**: 378-384.
10. Garcia-Sanchez, S., et al., *Candida albicans biofilms: a developmental state associated with specific and stable gene expression patterns*. Eukaryotic Cell, 2004. **3**: 536-45.
11. Smith, A.E., et al., *The mechanical properties of Saccharomyces cerevisiae*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2000. **97**: 9871-4.
12. Klis, F.M., et al., *Dynamics of cell wall structure in Saccharomyces cerevisiae*. FEMS microbiology reviews, 2002. **26**: 239-56.
13. Manners, D.J., A.J. Masson, and J.C. Patterson, *The structure of a beta-(1 leads to 3)-D-glucan from yeast cell walls*. The Biochemical journal, 1973. **135**: 19-30.
14. Osumi, M., *The ultrastructure of yeast: cell wall structure and formation*. Micron, 1998. **29**: 207-33.
15. Marquardt, H., *Der Feinbau von Hefezellen im Elektronenmikroskop 2. Saccharomyces cerevisiae-Stämme*. Zeitschrift für Naturforschung Teil B-Chemie Biochemie Biophysik Biologie und verwandte Gebiete, 1962. **B 17**: 689-&.
16. Cappellaro, C., et al., *Mating type-specific cell-cell recognition of Saccharomyces cerevisiae: cell wall attachment and active sites of α - and α -agglutinin*. The EMBO Journal, 1994. **13**: 4737-44.
17. Lipke, P.N. and J. Kurjan, *Sexual agglutination in budding yeasts: structure, function, and regulation of adhesion glycoproteins*. Microbiological reviews, 1992. **56**: 180-94.
18. Reynolds, T.B. and G.R. Fink, *Bakers' yeast, a model for fungal biofilm formation*. Science, 2001. **291**: 878-81.
19. Gonzalez, M., et al., eds. *Glycoconjugate structure and function in fungal cell walls*. Microbial Glycobiology: Structures, Relevance, and Applications 2009. 169-183.

20. Klis, F.M., P. De Groot, and K. Hellingwerf, *Molecular organization of the cell wall of Candida albicans*. Medical Mycology, 2001. **39**: 1-8.
21. Cormack, B.P., N. Ghorri, and S. Falkow, *An adhesin of the yeast pathogen Candida glabrata mediating adherence to human epithelial cells*. Science, 1999. **285**: 578-82.
22. de Groot, P.W., et al., *The cell wall of the human pathogen Candida glabrata: differential incorporation of novel adhesin-like wall proteins*. Eukaryotic Cell, 2008. **7**: 1951-64.
23. Xie, X. and P.N. Lipke, *On the evolution of fungal and yeast cell walls*. Yeast, 2010. **27**: 479-88.
24. Dranginis, A.M., et al., *A Biochemical Guide to Yeast Adhesins: Glycoproteins for Social and Antisocial Occasions*. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 2007. **71**: 282-294.
25. Brückner, S. and H.U. Mösch, *Choosing the right lifestyle: adhesion and development in Saccharomyces cerevisiae*. FEMS microbiology reviews, 2012. **36**: 25-58.
26. Guo, B., et al., *A Saccharomyces gene family involved in invasive growth, cell-cell adhesion, and mating*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2000. **97**: 12158-63.
27. de Groot, P.W. and F.M. Klis, *The conserved PA14 domain of cell wall-associated fungal adhesins governs their glycan-binding specificity*. Molecular Microbiology, 2008. **68**: 535-7.
28. Hoyer, L.L., T.L. Payne, and J.E. Hecht, *Identification of Candida albicans ALS2 and ALS4 and localization of als proteins to the fungal cell surface*. Journal of Bacteriology, 1998. **180**: 5334-43.
29. Verstrepen, K.J., et al., *Origins of variation in the fungal cell surface*. Nature Genetics, 2005. **37**: 986-990.
30. Veelders, M., et al., *Structural basis of flocculin-mediated social behavior in yeast*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2010. **107**: 22511-6.
31. Salgado, P.S., et al., *Structural basis for the broad specificity to host-cell ligands by the pathogenic fungus Candida albicans*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2011. **108**: 15775-9.
32. Jentoft, N., *Why are proteins O-glycosylated?* Trends in Biochemical Sciences, 1990. **15**: 291-4.
33. Ramsook, C.B., et al., *Yeast cell adhesion molecules have functional amyloid-forming sequences*. Eukaryotic Cell, 2010. **9**: 393-404.
34. Frank, A.T., et al., *Structure and function of glycosylated tandem repeats from Candida albicans Als adhesins*. Eukaryotic Cell, 2010. **9**: 405-14.
35. Lu, C.F., et al., *Glycosyl phosphatidylinositol-dependent cross-linking of alpha-agglutinin and beta 1,6-glucan in the Saccharomyces cerevisiae cell wall*. The Journal of cell biology, 1995. **128**: 333-40.
36. Verstrepen, K.J., et al., *Yeast flocculation: what brewers should know*. Applied Microbiology and Biotechnology, 2003. **61**: 197-205.
37. Pretorius, I.S., *Tailoring wine yeast for the new millennium: novel approaches to the ancient art of winemaking*. Yeast, 2000. **16**: 675-729.
38. Kjeldsen, T., *Yeast secretory expression of insulin precursors*. Applied Microbiology and Biotechnology, 2000. **54**: 277-86.
39. Saitoh, S., et al., *Genetically engineered wine yeast produces a high concentration of L-lactic acid of extremely high optical purity*. Applied and environmental microbiology, 2005. **71**: 2789-92.

40. Maury, J., et al., *Microbial isoprenoid production: an example of green chemistry through metabolic engineering*. Advances in biochemical engineering/biotechnology, 2005. **100**: 19-51.
41. Narihiro, T. and Y. Sekiguchi, *Microbial communities in anaerobic digestion processes for waste and wastewater treatment: a microbiological update*. Current Opinion in Biotechnology, 2007. **18**: 273-8.
42. Soares, E.V. and H.M. Soares, *Bioremediation of industrial effluents containing heavy metals using brewing cells of Saccharomyces cerevisiae as a green technology: a review*. Environmental science and pollution research international, 2011.
43. Verstrepen, K.J. and F.M. Klis, *Flocculation, adhesion and biofilm formation in yeasts*. Molecular Microbiology, 2006. **60**: 5-15.
44. Kobayashi, O., et al., *Region of Flo1 proteins responsible for sugar recognition*. Journal of Bacteriology, 1998. **180**: 6503-10.
45. Teunissen, A.W. and H.Y. Steensma, *The Dominant Flocculation Genes of Saccharomyces cerevisiae Constitute a New Subtelomeric Gene Family*. Yeast, 1995. **11**: 1001-1013.
46. Masy, C.L., A. Henquinet, and M.M. Mestdagh, *Flocculation of Saccharomyces cerevisiae: inhibition by sugars*. Canadian journal of microbiology, 1992. **38**: 1298-306.
47. Bauer, F.F., P. Govender, and M.C. Bester, *Yeast flocculation and its biotechnological relevance*. Applied Microbiology and Biotechnology, 2010. **88**: 31-9.
48. Lo, W. and A. Dranginis, *FLO11, a yeast gene related to the STA genes, encodes a novel cell surface flocculin*. Journal of Bacteriology, 1996. **178**: 7144-7151.
49. Bayly, J.C., et al., *Characteristics of Flo11-dependent flocculation in Saccharomyces cerevisiae*. FEMS Yeast Research, 2005. **5**: 1151-1156.
50. Gottschling, D.E., et al., *Position effect at S. cerevisiae telomeres: reversible repression of Pol II transcription*. Cell, 1990. **63**: 751-62.
51. Halme, A., et al., *Genetic and epigenetic regulation of the FLO gene family generates cell-surface variation in yeast*. Cell, 2004. **116**: 405-15.
52. Goossens, K. and R. Willaert, *Flocculation protein structure and cell-cell adhesion mechanism in Saccharomyces cerevisiae*. Biotechnology letters, 2010. **32**: 1571-85.
53. Stewart, G. and I. Russell, *Yeast flocculation*. Brewing science, 1981. **2**: 61-92.
54. Rupp, S., et al., *MAP kinase and cAMP filamentation signaling pathways converge on the unusually large promoter of the yeast FLO11 gene*. The EMBO Journal, 1999. **18**: 1257-1269.
55. Braus, G.H., et al., *Amino acid starvation and Gcn4p regulate adhesive growth and FLO11 gene expression in Saccharomyces cerevisiae*. Molecular Biology of the Cell, 2003. **14**: 4272-84.
56. Desai, C., J. Mavrianos, and N. Chauhan, *Candida glabrata Pwp7p and Aed1p are required for adherence to human endothelial cells*. FEMS yeast research, 2011. **11**: 595-601.
57. Petosa, C., et al., *Crystal structure of the anthrax toxin protective antigen*. Nature, 1997. **385**: 833-838.
58. Rigden, D.J., L.V. Mello, and M.Y. Galperin, *The PA14 domain, a conserved all-β domain in bacterial toxins, enzymes, adhesins and signaling molecules*. Trends in Biochemical Sciences, 2004. **29**: 335-339.
59. Yoshida, E., et al., *Role of a PA14 domain in determining substrate specificity of a glycoside hydrolase family 3 beta-glucosidase from Kluyveromyces marxianus*. The Biochemical journal, 2010. **431**: 39-49.

60. Larsbrink, J., et al., *Structural and enzymatic characterization of a glycoside hydrolase family 31 alpha-xylosidase from Cellvibrio japonicus involved in xyloglucan saccharification*. The Biochemical journal, 2011. **436**: 567-80.
61. Punta, M., et al., *The Pfam protein families database*. Nucleic Acids Research, 2012. **40**: 290-301.
62. Kolbinger, A., et al., *A cysteine-rich extracellular protein containing a PA14 domain mediates quorum sensing in Dictyostelium discoideum*. Eukaryotic Cell, 2005. **4**: 991-998.
63. Scherer, S.E., et al., *The finished DNA sequence of human chromosome 12*. Nature, 2006. **440**: 346-51.
64. Hogan, M.C., et al., *PKHD1, a homolog of the autosomal recessive polycystic kidney disease gene, encodes a receptor with inducible T lymphocyte expression*. Human molecular genetics, 2003. **12**: 685-98.
65. Nusbaum, C., et al., *DNA sequence and analysis of human chromosome 8*. Nature, 2006. **439**: 331-5.
66. Stewart, G. and T. Goring, *Effect of some monovalent and divalent metal ions on the flocculation of brewer's yeast strains*. Journal of the The Institute of Brewing, 1976. **82**: 341-342.
67. Stratford, M., *Evidence for two mechanisms of flocculation in Saccharomyces cerevisiae*. Yeast, 1989. **5**: 441-5.
68. Bony, M., et al., *Localization and cell surface anchoring of the Saccharomyces cerevisiae flocculation protein Flo1p*. Journal of Bacteriology, 1997. **179**: 4929-36.
69. Watari, J., et al., *Molecular cloning and analysis of the yeast flocculation gene FLO1*. Yeast, 1994. **10**: 211-25.
70. Verstrepen, K., et al., *Late fermentation expression of FLO1 in Saccharomyces cerevisiae*. Journal of the American Society of Brewing Chemists, 2001. **59**: 69-76.
71. Govender, P., et al., *Controlled expression of the dominant flocculation genes FLO1, FLO5, and FLO11 in Saccharomyces cerevisiae*. Applied and environmental microbiology, 2008. **74**: 6041-52.
72. Ogata, T., et al., *Chromosomal location of Lg-FLO1 in bottom-fermenting yeast and the FLO5 locus of industrial yeast*. Journal of applied microbiology, 2008. **105**: 1186-98.
73. Dujon, B., et al., *Genome evolution in yeasts*. Nature, 2004. **430**: 35-44.
74. De Las Penas, A., et al., *Virulence-related surface glycoproteins in the yeast pathogen Candida glabrata are encoded in subtelomeric clusters and subject to RAPI- and SIR-dependent transcriptional silencing*. Genes & Development, 2003. **17**: 2245-58.
75. Castano, I., et al., *Telomere length control and transcriptional regulation of subtelomeric adhesins in Candida glabrata*. Molecular Microbiology, 2005. **55**: 1246-58.
76. Sundstrom, P., *Adhesion in Candida spp*. Cellular microbiology, 2002. **4**: 461-9.
77. Zupancic, M.L., et al., *Glycan microarray analysis of Candida glabrata adhesin ligand specificity*. Molecular Microbiology, 2008. **68**: 547-59.
78. Puyesky, M., et al., *Developmental regulation of cmp1, a gene encoding a multidomain conidiospore surface protein of Trichoderma*. Fungal genetics and biology : FG & B, 1999. **27**: 88-99.
79. Pathak, D.T., et al., *Cell contact-dependent outer membrane exchange in myxobacteria: genetic determinants and mechanism*. PLoS genetics, 2012. **8**: e1002626.
80. Douglas, L.M., et al., *Expression and Characterization of the Flocculin Flo11/Muc1, a Saccharomyces cerevisiae Mannoprotein with Homotypic Properties of Adhesion?* Eukaryotic Cell, 2007. **6**: 2214-2221.

81. Ene, I.V. and R.J. Bennett, *Hwp1 and related adhesins contribute to both mating and biofilm formation in Candida albicans*. Eukaryotic Cell, 2009. **8**: 1909-13.
82. Lo, W.S. and A.M. Dranginis, *The Cell Surface Flocculin Flo11 Is Required for Pseudohyphae Formation and Invasion by Saccharomyces cerevisiae*. Molecular Biology of the Cell, 1998. **9**: 161-171.
83. Zara, S., et al., *FLO11-based model for air-liquid interfacial biofilm formation by Saccharomyces cerevisiae*. Applied and environmental microbiology, 2005. **71**: 2934-9.
84. Ishigami, M., et al., *FLO11 is the primary factor in flor formation caused by cell surface hydrophobicity in wild-type flor yeast*. Bioscience, biotechnology, and biochemistry, 2006. **70**: 660-666.
85. Van Mulders, S.E., et al., *Phenotypic diversity of Flo protein family-mediated adhesion in Saccharomyces cerevisiae*. FEMS yeast research, 2009. **9**: 178-90.
86. Goossens, K.V. and R.G. Willaert, *The N-terminal domain of the Flo11 protein from Saccharomyces cerevisiae is an adhesin without mannose-binding activity*. FEMS yeast research, 2012. **12**: 78-87.
87. Karunanithi, S., et al., *Shedding of the mucin-like flocculin Flo11p reveals a new aspect of fungal adhesion regulation*. Current biology : CB, 2010. **20**: 1389-95.
88. Mouassite, M., et al., *The 'SUN' family: yeast SUN4/SCW3 is involved in cell septation*. Yeast, 2000. **16**: 905-19.
89. Cappellaro, C., V. Mersa, and W. Tanner, *New potential cell wall glucanases of Saccharomyces cerevisiae and their involvement in mating*. Journal of Bacteriology, 1998. **180**: 5030-7.
90. Skory, C.D. and S.N. Freer, *Cloning and characterization of a gene encoding a cell-bound, extracellular beta-glucosidase in the yeast Candida wickerhamii*. Applied and environmental microbiology, 1995. **61**: 518-25.
91. Adams, D.J., *Fungal cell wall chitinases and glucanases*. Microbiology, 2004. **150**: 2029-35.
92. Camougrand, N.M., et al., *The "SUN" family: UTH1, an ageing gene, is also involved in the regulation of mitochondria biogenesis in Saccharomyces cerevisiae*. Archives of biochemistry and biophysics, 2000. **375**: 154-60.
93. Velours, G., et al., *Dual cell wall/mitochondria localization of the 'SUN' family proteins*. FEMS microbiology letters, 2002. **207**: 165-72.
94. Firon, A., et al., *The SUN41 and SUN42 genes are essential for cell separation in Candida albicans*. Molecular Microbiology, 2007. **66**: 1256-75.
95. Hiller, E., et al., *Candida albicans Sun41p, a putative glycosidase, is involved in morphogenesis, cell wall biogenesis, and biofilm formation*. Eukaryotic Cell, 2007. **6**: 2056-65.
96. Norice, C.T., et al., *Requirement for Candida albicans Sun41 in biofilm formation and virulence*. Eukaryotic Cell, 2007. **6**: 2046-55.
97. Buchan, D.W., et al., *Protein annotation and modelling servers at University College London*. Nucleic Acids Research, 2010. **38**: 563-8.
98. Jones, D.T., *Protein secondary structure prediction based on position-specific scoring matrices*. Journal of molecular biology, 1999. **292**: 195-202.
99. Linding, R., et al., *GlobPlot: Exploring protein sequences for globularity and disorder*. Nucleic Acids Research, 2003. **31**: 3701-8.
100. Studier, F.W. and B.A. Moffatt, *Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes*. J Mol Biol, 1986. **189**: 113-30.
101. Dubendorff, J.W. and F.W. Studier, *Controlling Basal Expression in an Inducible T 7 Expression System by Blocking the Target T 7 Promotor with Lac Repressor*. Journal of molecular biology, 1991. **219**: 45-59.

102. Bessette, P.H., et al., *Efficient folding of proteins with multiple disulfide bonds in the Escherichia coli cytoplasm*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1999. **96**: 13703.
103. zu Eulenburg, G.G., *Strukturelle und funktionelle Charakterisierung von Adhäsinen aus humanpathogenen Candida-Spezies*, Diplomarbeit, Fachbereich Chemie 2009, Philipps-Universität Marburg
104. Lambo, J., *Strukturelle und funktionelle Charakterisierung von Sun4*, Diplomarbeit, Fachbereich Chemie 2010, Philipps-Universität Marburg
105. Veelders, M.S., *Flokkuline aus Saccharomyces cerevisiae: Funktionelle und strukturelle Untersuchungen*, Diplomarbeit, Fachbereich Chemie 2008, Philipps-Universität Marburg
106. Mullis, K.B. and F.A. Faloona, *Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction*. Methods in enzymology, 1987. **155**: 335-350.
107. Integrated_DNA_Technologies. *OligoAnalyzer 3.1*. [zitiert am 07.03.2012]; URL: <http://eu.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/>
108. Shuman, S., *Novel approach to molecular cloning and polynucleotide synthesis using vaccinia DNA topoisomerase*. Journal of Biological Chemistry, 1994. **269**: 32678-32684.
109. Sanger, F., S. Nicklen, and A.R. Coulson, *DNA Sequencing with Chain-Terminating Inhibitors*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1977. **74**: 5463-5467.
110. Vogelstein, B. and D. Gillespie, *Preparative and Analytical Purification of DNA from Agarose*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1979. **76**: 615-619.
111. Bertani, G., *STUDIES ON LYSOGENESIS I.: The Mode of Phage Liberation by Lysogenic Escherichia coli*. Journal of Bacteriology, 1951. **62**: 293.
112. Hendrickson, W.A., J.L. Smith, and S. Sheriff, *Direct phase determination based on anomalous scattering*. Methods in enzymology, 1985. **115**: 41-55.
113. Hendrickson, W.A., J.R. Horton, and D.M. LeMaster, *Selenomethionyl proteins produced for analysis by multiwavelength anomalous diffraction (MAD): a vehicle for direct determination of three-dimensional structure*. The EMBO Journal, 1990. **9**: 1665-72.
114. Cowie, D.B. and G.N. Cohen, *Biosynthesis by Escherichia coli of active altered proteins containing selenium instead of sulfur*. Biochimica et biophysica acta, 1957. **26**: 252-261.
115. Adelberg, E.A. and S.N. Burns, *Genetic variation in the sex factor of Escherichia coli*. Journal of Bacteriology, 1960. **79**: 321-30.
116. Porath, J., et al., *Metal chelate affinity chromatography, a new approach to protein fractionation*. Nature, 1975. **258**: 598-599.
117. Porath, J., *Gel filtration: a method for desalting and group separation*. Nature, 1959. **183**: 1657-59.
118. Laemmli, U.K., *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. Nature, 1970. **227**: 680-685.
119. Bennett, J. and K.J. Scott, *Quantitative staining of fraction I protein in polyacrylamide gels using Coomassie brilliant blue*. Analytical Biochemistry, 1971. **43**: 173-82.
120. Gill, S.C. and P.H. von Hippel, *Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data*. Analytical Biochemistry, 1989. **182**: 319-26.
121. Gasteiger, E., et al., *Protein identification and analysis tools on the ExPASy server*. The Proteomics Protocols Handbook, 2005: 571-607.
122. Kelly, S.M. and N.C. Price, *The use of circular dichroism in the investigation of protein structure and function*. Current Protein & Peptide Science, 2000. **1**: 349-384.

123. Greenfield, N.J., *Methods to Estimate the Conformation of Proteins and Polypeptides from Circular Dichroism Data*. Analytical Biochemistry, 1996. **235**: 1-10.
124. Stokes, G.G., *On the change of refrangibility of light*. Philosophical Transactions of the Royal Society of London, 1852. **142**: 463-562.
125. Consortium_for_Functional_Glycomics. [zitiert am 30.04.2012]; URL: <http://www.functionalglycomics.org/static/consortium/resources/resourcecoreh8.shtml>
126. Ehrenberg, W. and A. Franks, *Small-angle x-ray scattering*. Nature, 1952. **170**: 1076-7.
127. Henderson, R., *Realizing the potential of electron cryo-microscopy*. Quarterly reviews of biophysics, 2004. **37**: 3-13.
128. Wuthrich, K., *Protein structure determination in solution by NMR spectroscopy*. The Journal of biological chemistry, 1990. **265**: 22059-62.
129. Wüthrich, K., *NMR of proteins and nucleic acids*. Vol. 3. 1986: Wiley-Interscience.
130. Liu, G., et al., *NMR data collection and analysis protocol for high-throughput protein structure determination*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2005. **102**: 10487-92.
131. Berman, H., et al., *The worldwide Protein Data Bank (wwPDB): ensuring a single, uniform archive of PDB data*. Nucleic Acids Research, 2007. **35**: 301-3.
132. Schmidt, A., et al., *Crystal structure of small protein crambin at 0.48 Å resolution*. Acta crystallographica. Section F, Structural biology and crystallization communications, 2011. **67**: 424-8.
133. Dasgupta, S., et al., *Extent and nature of contacts between protein molecules in crystal lattices and between subunits of protein oligomers*. Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics, 1997. **28**: 494-514.
134. Sondergaard, C.R., et al., *Structural artifacts in protein-ligand X-ray structures: implications for the development of docking scoring functions*. Journal of medicinal chemistry, 2009. **52**: 5673-84.
135. Jancarik, J. and S.H. Kim, *Sparse matrix sampling: a screening method for crystallization of proteins*. Journal of applied crystallography, 1991. **24**: 409-411.
136. Blow, N., *Structural genomics: inside a protein structure initiative center*. Nature methods, 2008. **5**: 203-7.
137. Davies, D.R. and D.M. Segal, *Protein Crystallization: Micro Techniques Involving Vapor Diffusion*. Methods in Enzymology, 1971. **22**: 266-269.
138. Bergfors, T., *Seeds to crystals*. Journal of structural biology, 2003. **142**: 66-76.
139. Hassell, A.M., et al., *Crystallization of protein-ligand complexes*. Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography, 2007. **63**: 72-9.
140. Munshi, S., et al., *Rapid X-ray diffraction analysis of HIV-1 protease-inhibitor complexes: inhibitor exchange in single crystals of the bound enzyme*. Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography, 1998. **54**: 1053-1060.
141. Battye, T.G., et al., *iMOSFLM: a new graphical interface for diffraction-image processing with MOSFLM*. Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography, 2011. **67**: 271-81.
142. Leslie, A.G.W. and H.R. Powell, *Processing diffraction data with MOSFLM*. Evolving Methods for Macromolecular Crystallography, 2007. **245**: 41-51.
143. Incardona, M.F., et al., *EDNA: a framework for plugin-based applications applied to X-ray experiment online data analysis*. Journal of synchrotron radiation, 2009. **16**: 872-879.
144. Kabsch, W., *Xds*. Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography, 2010. **66**: 125-32.
145. Evans, P., *Scaling and assessment of data quality*. Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography, 2006. **62**: 72-82.

146. *The CCP4 suite: programs for protein crystallography*. Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography, 1994. **50**: 760-3.
147. Hendrickson, W.A., *Analysis of protein structure from diffraction measurement at multiple wavelengths*. Transactions of the American Crystallographic Association, 1985. **21**.
148. Crick, F. and B.S. Magdoff, *The theory of the method of isomorphous replacement for protein crystals. I*. Acta Crystallographica, 1956. **9**: 901-908.
149. Rossmann, M.G., et al., *Molecular symmetry of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*. Journal of molecular biology, 1972. **64**: 237-45.
150. Green, D., V. Ingram, and M. Perutz, *The structure of haemoglobin. IV. Sign determination by the isomorphous replacement method*. Proceedings of the Royal Society of London. Series A. Mathematical and Physical Sciences, 1954. **225**: 287-307.
151. Sheldrick, G.M., *A short history of SHELX*. Acta crystallographica. Section A, Foundations of crystallography, 2008. **64**: 112-22.
152. McCoy, A.J., et al., *Phaser crystallographic software*. Journal of applied crystallography, 2007. **40**: 658-674.
153. Patterson, A., *A Fourier series method for the determination of the components of interatomic distances in crystals*. Physical Review, 1934. **46**: 372.
154. Harker, D., *X-ray diffraction applied to crystalline proteins*. Advances in biological and medical physics, 1956. **4**: 1-22.
155. Rhodes, G., *Crystallography made crystal clear: a guide for users of macromolecular models* 2006: Academic press.
156. Shmueli, U., *International tables for crystallography: Reciprocal space*. Vol. 2. 2008: Wiley.
157. DiMaio, F., et al., *Improved molecular replacement by density- and energy-guided protein structure optimization*. Nature, 2011. **473**: 540-3.
158. Cowtan, K., *Book of Fourier*, 1994.
159. Morris, R.J., A. Perrakis, and V.S. Lamzin, *ARP/wARP and automatic interpretation of protein electron density maps*. Methods in enzymology, 2003. **374**: 229-44.
160. Emsley, P., et al., *Features and development of Coot*. Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography, 2010. **66**: 486-501.
161. Murshudov, G.N., A.A. Vagin, and E.J. Dodson, *Refinement of macromolecular structures by the maximum-likelihood method*. Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography, 1997. **53**: 240-55.
162. Brunger, A.T., *Free R value: a novel statistical quantity for assessing the accuracy of crystal structures*. Nature, 1992. **355**: 472-5.
163. DeLano, W.L., *The PyMOL molecular graphics system*. 2002.
164. Baker, N.A., et al., *Electrostatics of nanosystems: application to microtubules and the ribosome*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2001. **98**: 10037-41.
165. Steinkellner, G., et al., *VASCo: computation and visualization of annotated protein surface contacts*. BMC bioinformatics, 2009. **10**: 32.
166. Brennan, S. and P. Cowan, *A suite of programs for calculating x-ray absorption, reflection, and diffraction performance for a variety of materials at arbitrary wavelengths*. Review of scientific instruments, 1992. **63**: 850-853.
167. Stratford, M. and S. Assinder, *Yeast flocculation: Flo1 and NewFlo phenotypes and receptor structure*. Yeast, 1991. **7**: 559-74.
168. Kuntal, B.K., P. Aparoy, and P. Reddanna, *EasyModeller: A graphical interface to MODELLER*. BMC research notes, 2010. **3**: 226.

-
169. Eswar, N., et al., *Protein structure modeling with MODELLER*. Methods in molecular biology, 2008. **426**: 145-59.
 170. Maestre-Reyna, M., *Structural and functional studies of mucin-interacting adhesion domains from Candida glabrata and Helicobacter pylori*, Dissertation, Fachbereich Chemie 2011, Philipps-Universität Marburg
 171. Krissinel, E. and K. Henrick, *Secondary-structure matching (SSM), a new tool for fast protein structure alignment in three dimensions*. Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography, 2004. **60**: 2256-68.
 172. Panjikar, S., et al., *On the combination of molecular replacement and single-wavelength anomalous diffraction phasing for automated structure determination*. Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography, 2009. **65**: 1089-97.
 173. Cowtan, K., *Generic representation and evaluation of properties as a function of position in reciprocal space*. Journal of applied crystallography, 2002. **35**: 655-663.
 174. Terwilliger, T.C. and J. Berendzen, *Automated MAD and MIR structure solution*. Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography, 1999. **55**: 849-61.
 175. Ishigami, M., et al., *FLO11 is essential for flor formation caused by the C-terminal deletion of NRG1 in Saccharomyces cerevisiae*. FEMS microbiology letters, 2004. **237**: 425-30.
 176. Castillo, L., et al., *A study of the Candida albicans cell wall proteome*. Proteomics, 2008. **8**: 3871-81.
 177. Edwards, J.E., Jr., *Invasive candida infections--evolution of a fungal pathogen*. The New England journal of medicine, 1991. **324**: 1060-2.
 178. Kiselyov, V.V., et al., *Structural biology of NCAM homophilic binding and activation of FGFR*. Journal of Neurochemistry, 2005. **94**: 1169-1179.
 179. Miki, B.L.A., et al., *Possible mechanism for flocculation interactions governed by gene FLO1 in Saccharomyces cerevisiae*. Journal of Bacteriology, 1982. **150**: 878-889.
 180. Weis, W.I., K. Drickamer, and W.A. Hendrickson, *Structure of a C-type mannose-binding protein complexed with an oligosaccharide*. Nature, 1992. **360**: 127-34.
 181. Abrahams, J.P., et al., *Structure at 2.8 Å resolution of F1-ATPase from bovine heart mitochondria*. Nature, 1994. **370**: 621-628.
 182. Chevrier, B., et al., *Crystal structure of Aeromonas proteolytica aminopeptidase: A prototypical member of the co-catalytic zinc enzyme family*. Structure, 1994. **2**: 283.
 183. Lesage, G. and H. Bussey, *Cell wall assembly in Saccharomyces cerevisiae*. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 2006. **70**: 317-343.
 184. Lommel, M. and S. Strahl, *Protein O-mannosylation: Conserved from bacteria to humans*. Glycobiology, 2009. **19**: 816-828.
 185. Lehle, L., S. Strahl, and W. Tanner, *Protein glycosylation, conserved from yeast to man. A model organism helps elucidating congenital human diseases*. Angewandte Chemie, International Edition in English, 2006. **45**: 6802-6818.
 186. Javadekar, V.S., et al., *A mannose-binding protein from the cell surface of flocculent Saccharomyces cerevisiae (NCIM 3528): its role in flocculation*. Yeast, 2000. **16**: 99-110.
 187. Goossens, K.V., et al., *The N-terminal domain of the Flo1 flocculation protein from Saccharomyces cerevisiae binds specifically to mannose carbohydrates*. Eukaryotic Cell, 2011. **10**: 110-7.
 188. Groes, M., et al., *Purification, crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of the carbohydrate-binding domain of flocculin, a cell-adhesion molecule from Saccharomyces carlsbergensis*. Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography, 2002. **58**: 2135-7.
 189. Dawkins, R., *The Selfish Gene* 1976, Oxford: Oxford Univ. Press.

190. Gardner, A. and S.A. West, *Greenbeards*. Evolution; international journal of organic evolution, 2010. **64**: 25-38.
191. West, S.A. and A. Gardner, *Altruism, spite, and greenbeards*. Science, 2010. **327**: 1341-4.
192. Smukalla, S., et al., *FLO1 Is a Variable Green Beard Gene that Drives Biofilm-like Cooperation in Budding Yeast*. Cell, 2008. **135**: 726-737.
193. Krissinel, E. and K. Henrick, *Inference of macromolecular assemblies from crystalline state*. Journal of molecular biology, 2007. **372**: 774-97.
194. Fidalgo, M., et al., *Adaptive evolution by mutations in the FLO11 gene*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2006. **103**: 11228-33.
195. Zara, G., et al., *FLO11 gene length and transcriptional level affect biofilm-forming ability of wild flor strains of Saccharomyces cerevisiae*. Microbiology, 2009. **155**: 3838-46.
196. Roy, A., A. Kucukural, and Y. Zhang, *I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and function prediction*. Nature protocols, 2010. **5**: 725-38.
197. Ceroni, A., et al., *DISULFIND: a disulfide bonding state and cysteine connectivity prediction server*. Nucleic Acids Research, 2006. **34**: 177-81.
198. Ferre, F. and P. Clote, *DiANNA 1.1: an extension of the DiANNA web server for ternary cysteine classification*. Nucleic Acids Research, 2006. **34**: 182-5.
199. Passerini, A., M. Lippi, and P. Frasconi, *MetalDetector v2.0: predicting the geometry of metal binding sites from protein sequence*. Nucleic Acids Research, 2011. **39**: 288-92.
200. Larkin, M., et al., *Clustal W and Clustal X version 2.0*. Bioinformatics, 2007. **23**: 2947-2948.
201. Tamura, K., et al., *MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0*. Molecular biology and evolution, 2007. **24**: 1596-9.
202. Altschul, S.F., et al., *Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs*. Nucleic Acids Research, 1997. **25**: 3389-3402.
203. Vachova, L., et al., *Flo11p, drug efflux pumps, and the extracellular matrix cooperate to form biofilm yeast colonies*. The Journal of cell biology, 2011. **194**: 679-87.
204. Govender, P., S. Kroppenstedt, and F.F. Bauer, *Novel wine-mediated FLO11 flocculation phenotype of commercial Saccharomyces cerevisiae wine yeast strains with modified FLO gene expression*. FEMS microbiology letters, 2011. **317**: 117-26.
205. Kyte, J. and R.F. Doolittle, *A simple method for displaying the hydropathic character of a protein*. Journal of molecular biology, 1982. **157**: 105-32.
206. Pelissier, P., et al., *NCA3, a nuclear gene involved in the mitochondrial expression of subunits 6 and 8 of the Fo-F1 ATP synthase of S. cerevisiae*. Current Genetics, 1995. **27**: 409-16.
207. Ritch, J.J., et al., *The Saccharomyces SUN gene, UTH1, is involved in cell wall biogenesis*. FEMS yeast research, 2010. **10**: 168-176.
208. Ashkenazy, H., et al., *ConSurf 2010: calculating evolutionary conservation in sequence and structure of proteins and nucleic acids*. Nucleic Acids Research, 2010. **38**: 529-33.
209. Davies, G. and B. Henrissat, *Structures and mechanisms of glycosyl hydrolases*. Structure, 1995. **3**: 853-9.
210. Quiocho, F., *Protein-carbohydrate interactions: basic molecular features*. Pure and Applied Chemistry, 1989. **61**: 1293-1306.
211. Weis, W.I. and K. Drickamer, *Structural basis of lectin-carbohydrate recognition*. Annual review of biochemistry, 1996. **65**: 441-473.

-
212. Koshland Jr, D., *Stereochemistry and the mechanism of enzymatic reactions*. Biological Reviews, 1953. **28**: 416-436.
213. Weis, W.I., et al., *Structure of the calcium-dependent lectin domain from a rat mannose-binding protein determined by MAD phasing*. Science, 1991. **254**: 1608-1615.
214. Colman, P., L. Weaver, and B. Matthews, *Rare earths as isomorphous calcium replacements for protein crystallography*. Biochemical and biophysical research communications, 1972. **46**: 1999-2005.
215. Ma, B.Q., et al., *The formation of Gd4O4 cubane cluster controlled by L-valine*. New Journal of Chemistry, 2000. **24**: 251-252.
216. Costes, J.P., F. Dahan, and F. Nicodème, *A trinuclear gadolinium complex: structure and magnetic properties*. Inorganic Chemistry, 2001. **40**: 5285-5287.
217. Golovin, A. and K. Henrick, *MSDmotif: exploring protein sites and motifs*. BMC bioinformatics, 2008. **9**: 312.
218. Saxena, A.K., et al., *The essential mosquito-stage P25 and P28 proteins from Plasmodium form tile-like triangular prisms*. Nature structural & molecular biology, 2006. **13**: 90-1.
219. Goncalves, S., et al., *Three-Dimensional Structure of Mannosyl-3-phosphoglycerate Phosphatase from Thermus thermophilus HB27: A New Member of the Haloalcanoic Acid Dehalogenase Superfamily*. Biochemistry, 2011. **50**: 9551-67.
220. Walker, E.H., et al., *Structural insights into phosphoinositide 3-kinase catalysis and signalling*. Nature, 1999. **402**: 313-319.
221. Zeth, K., et al., *Iron-oxo clusters biomineralizing on protein surfaces: structural analysis of Halobacterium salinarum DpsA in its low- and high-iron states*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2004. **101**: 13780-5.
222. Haldar, S., et al., *Moving Iron through ferritin protein nanocages depends on residues throughout each four alpha-helix bundle subunit*. The Journal of biological chemistry, 2011. **286**: 25620-7.
223. Caravan, P., *Protein-targeted gadolinium-based magnetic resonance imaging (MRI) contrast agents: design and mechanism of action*. Accounts of chemical research, 2009. **42**: 851-62.
224. Pitarch, A., C. Nombela, and C. Gil, *Cell wall fractionation for yeast and fungal proteomics*. Methods in molecular biology, 2008. **425**: 217-39.
225. Bowman, S.M. and S.J. Free, *The structure and synthesis of the fungal cell wall*. BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology, 2006. **28**: 799-808.
226. Molina, M., et al., *Protein localisation approaches for understanding yeast cell wall biogenesis*. Microscopy research and technique, 2000. **51**: 601-12.
227. Yin, Q.Y., et al., *Mass spectrometry-based proteomics of fungal wall glycoproteins*. Trends in microbiology, 2008. **16**: 20-6.

7 Anhang

7.1 Kristallographische Statistiken

7.1.1 Datensammlungs- und Verfeinerungsstatistiken *Soaking*-Experimente zur Glykanspezifität von Flo5A

Tab.7.1: Datensammlungs- und Verfeinerungsstatistiken *Soaking*-Experimente Flo5A

Datensatz	MV134	MV133	MV132	MV177
Ligand	α -1,2-Mannobiose	α -1,3-Mannobiose	α -1,6-Mannobiose	Gemisch dieser Mannobiosen
Ligand-konzentration	50 mM	50 mM	50 mM	je 16.6 mM
Datum	16.01.2009	02.02.2009	15.12.2008	16.03.2009
Röntgenquelle	FR591	ESRF ID23-1	FR591	FR591
Wellenlänge (Å)	1.5418	0.7699	1.5418	1.5418
Detektor	MAR345	ADSC Q315r	MAR345	MAR345
Temperatur (K)	100	100	100	100
Raumgruppe	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁
Zellmaße (Å)				
a	46.4	46.22	46.3	46.3
b	61.9	61.02	61.6	61.7
c	106.1	106.5	106.3	106.2
α , β , γ	90°, 90°, 90°	90°, 90°, 90°	90°, 90°, 90°	90°, 90°, 90°
Moleküle / a.s.u.	1	1	1	1
Auflösung (Å)	19.38 – 1.74 (1.83 – 1.74)	19.37 – 1.2 (1.26 – 1.20)	19.39 – 1.55 (1.63 – 1.55)	19.31 – 1.87 1.97 – 1.87
beobachtete Reflexe	110843	507875	177367	97079
einzigartige Reflexe	32097	94345	44795	25502
Vollständigkeit (%)	99.3 (96.5)	99.6 (100.0)	99.3 (97.0)	98.7 (95.6)
Multiplizität	3.5 (3.3)	5.4 (5.4)	4.0 (3.7)	3.8 (3.5)
Mittleres I/ σ (I)	17.6 (4.5)	16.9 (2.5)	46.4 (15.8)	9.7 (2.5)
R _{merge} (%)	5.3 (26.8)	5.4 (61.8)	1.7 (9.4)	11.9 (61.2)
Auflösung	19.38 – 1.74	19.35 – 1.20	19.33 – 1.55	19.31 – 1.87
R _{work} (%)	18.3	19.6	17.4	20.0
R _{free} (%)	20.8	21.7	20.5	25.2
Reflektionen				
work	31509	92616	44000	25045
test	588	1727	794	457
mittlerer B _{wert} (Å ²)	18.4	15.4	15.4	26.7
r.m.s.d.				
Bdglänge(Å)	0.013	0.007	0.009	0.018
Bdgsinkel (°)	1.36	1.21	1.25	1.62

7.1.2 Datensammlungs- und Verfeinerungsstatistiken deponierter Flo5A-Strukturen

Tab.7.2: Datensammlungs- und Verfeinerungsstatistiken Flo5A

Datensatz	MV120	MV208	MV201
PDB-ID	2XJP	2XJS	2XJR
Ligand	Mannose	α -1,2-Mannobiose	Man5(D2-D3)
Ligand-konzentration	2 M	50 mM	50 mM
Datum	24.11.2008	12.05.2009	12.05.2009
Röntgenquelle	ESRF ID29	ESRF ID14-2	ESRF ID14-2
Wellenlänge (Å)	0.9149	0.933	0.933
Detektor	ADSC Q315r	ADSC Q4	ADSC Q4
Temperatur (K)	100	100	100
Raumgruppe	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁
Zellmaße (Å)			
a	46.3	46.5	46.5
b	61.8	62.0	61.9
c	106.3	106.5	106.4
α , β , γ	90°, 90°, 90°	90°, 90°, 90°	90°, 90°, 90°
Moleküle / a.s.u.	1	1	1
Auflösung (Å)	40.29 – 0.95 (1.0 – 0.95)	19.44 – 1.24 (1.30 – 1.24)	19.43 – 1.25 (1.32 – 1.24)
beobachtete Reflexe	790095	295380	913485
einzigartige Reflexe	190329	82470	85499
Vollständigkeit (%)	99.3 (95.7)	93.7 (72.4)	99.8 (99.2)
Multiplizität	4.2 (3.7)	3.6 (3.2)	10.7 (7.9)
Mittleres I/ σ (I)	19.6 (2.8)	20.5 (2.9)	21.0 (3.6)
R _{merge} (%)	2.9 (43.7)	3.6 (44.4)	7.0 (59.3)
Auflösung	20.0 – 0.95	19.44 – 1.30	19.35 – 1.25
R _{work} (%)	10.5	12.3	11.4
R _{free} (%)	12.2	15.2	14.0
Reflektionen			
work	186922	72600	83938
test	3390	1374	1561
mittlerer B _{wert} (Å ²)	12.3	11.5	10.4
r.m.s.d.			
Bdglänge(Å)	0.014	0.012	0.012
Bdgswinkel (°)	1.75	1.992	1.82

7.1.3 Datensammlungs- und Verfeinerungsstatistiken Flo5A-Mutanten

Tab.7.3: Datensammlungs- und Verfeinerungsstatistiken Flo5A-Varianten

Datensatz	MV157	MV335	MV431	MV432	MV369
Mutante	Y222F	S227A	Q98A	Q98A	D202T
PDB-ID	/	2XJU	/	/	2XJV
Ligand	/	α -1,2-Mannobiose	Glucose	Mannose	Glucose
Ligand-konzentration	/	50 mM	50 mM	50 mM	2M
Datum	18.02.2009	24.08.2009	09.04.2010	10.04.2010	23.11.2009
Röntgenquelle	FR591	FR591	FR591	FR591	FR591
Wellenlänge (Å)	1.5418	1.5418	1.5418	1.5418	1.5418
Detektor	MAR345	MAR345	MAR345	MAR345	MAR345
Temperatur (K)	100	100	100	100	100
Raumgruppe	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁
Zellmaße (Å)					
a	46.4	46.3	46.4	46.4	46.5
b	62.3	62.6	61.9	61.9	62.4
c	105.8	105.8	106.1	106.1	106.2
α, β, γ	90°, 90°, 90°	90°, 90°, 90°	90°, 90°, 90°	90°, 90°, 90°	90°, 90°, 90°
Moleküle / a.s.u.	1	1	1	1	1
Auflösung (Å)	19.39 – 1.67 (1.76 – 1.67)	19.40-1.67 (1.76 – 1.67)	17.82 – 1.70 (1.79 – 1.70)	19.39 – 1.70 (1.79 – 1.70)	19.42 – 1.74 (1.83 – 1.74)
beobachtete Reflexe	122946	125571	114136	117224	216633
einzigartige Reflexe	36095	35802	32900	33835	32352
Vollständigkeit (%)	98.7 (92.7)	98.2 (93.9)	96.0 (93.4)	98.6 (94.5)	99.8 (99.3)
Multiplizität	3.4 (3.2)	3.5 (3.4)	3.5 (3.4)	3.5 (3.3)	6.7 (6.2)
Mittleres I/ σ (I)	15.3 (4.1)	18.4 (5.0)	12.6 (3.0)	14.7 (3.8)	12.6 (2.8)
R _{merge} (%)	5.7 (28.8)	5.1 (27.2)	8.1 (42.7)	6.6 (35.7)	11.8 (66.5)
Auflösung	19.33 – 1.67	19.40 – 1.7	17.76 – 1.7	19.39 – 1.7	19.36 – 1.74
R _{work} (%)	17.8	16.4	19.7	18.0	18.1
R _{free} (%)	19.7	19.7	22.5	20.6	21.9
Reflektionen					
work	35441	33558	32224	33164	31755
test	653	624	601	615	593
mittlerer B _{wert} (Å ²)	17.1	15.9	17.1	16.4	17.1
r.m.s.d.					
Bdglänge(Å)	0.011	0.013	0.014	0.012	0.012
Bdgsinkel (°)	1.30	1.69	1.455	1.38	1.26

7.1.4 Datensammlungs- und Verfeinerungsstatistiken Flo5A-Gadolinium-Cluster

Tab.7.4: Datensammlungs- und Verfeinerungsstatistiken Flo5A-Gadolinium-Cluster

Datensatz	MV235	MV600	MV601	MV613	MV618
Variante	Flo5A Gd ³⁺	Flo5A 9' Gd ³⁺	Flo5A 19' Gd ³⁺	Flo5A 41' Gd ³⁺	Flo5A 60' Gd ³⁺
PDB-ID	4AHW	4AI0	4AI1	4AI2	4AI3
Datum	12.06.2009	08.11.2010	08.11.2010	08.11.2010	08.11.2010
Röntgenquelle	FR591	ESRF ID23-1	ESRF ID23-1	ESRF ID23-1	ESRF ID23-1
Wellenlänge (Å)	1.5418	1.7118	1.7118	1.7118	1.7118
Detektor	MAR345	ADSC Q315r	ADSC Q315r	ADSC Q315r	ADSC Q315r
Temperatur (K)	100	100	100	100	100
Raumgruppe	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁
Zellmaße (Å)					
a	46.3	46.2	46.2	46.1	46.1
b	64.3	62.7	62.7	63.4	64.2
c	104.7	105.7	105.6	105.1	104.7
α, β, γ	90°, 90°, 90°	90°, 90°, 90°	90°, 90°, 90°	90°, 90°, 90°	90°, 90°, 90°
Moleküle / a.s.u.	1	1	1	1	1
Auflösung (Å)	19.44 – 1.50 (1.58 – 1.50)	42.31 – 1.8 (1.90 – 1.80)	35.06 – 1.7 (1.79 – 1.70)	42.23 – 1.80 (1.90 – 1.80)	42.18 – 1.9 (2.00 – 1.90)
beobachtete Reflexe	230927	96070	729620	106447	112345
einzigartige Reflexe	50469	29050	33799	29065	23727
Vollständigkeit (%)	99.4 (98.5)	99.7 (99.9)	98.0 (88.1)	99.3 (99.9)	94.6 (91.6)
Multiplizität	4.6 (4.4)	3.3 (3.2)	3.8 (2.4)	3.7 (3.5)	4.7 (4.8)
Mittleres I/σ(I)	18.6 (4.0)	21.6 (3.9)	22.7 (1.7)	36.1 (12.9)	21.2 (16.2)
R _{merge} (%)	5.0 (35.4)	4.1 (31.5)	3.8 (47.8)	2.4 (8.6)	5.9 (6.7)
Auflösung	19.29 – 1.5	40.58 – 1.80	40.58 – 1.80	40.58 – 1.80	40.58 – 1.9
R _{work} (%)	13.2	17.7	17.2	16.0	16.6
R _{free} (%)	17.5	21.8	21.0	19.5	22.2
Reflexionen					
work	49565	28379	28412	28492	23265
test	903	525	527	523	427
mittlerer B _{wert} (Å ²)	16.8	14.0	15.3	14.4	12.5
r.m.s.d.					
Bdglänge(Å)	0.011	0.009	0.010	0.090	0.010
Bdgswinkel (°)	1.68	1.31	1.46	1.34	1.36

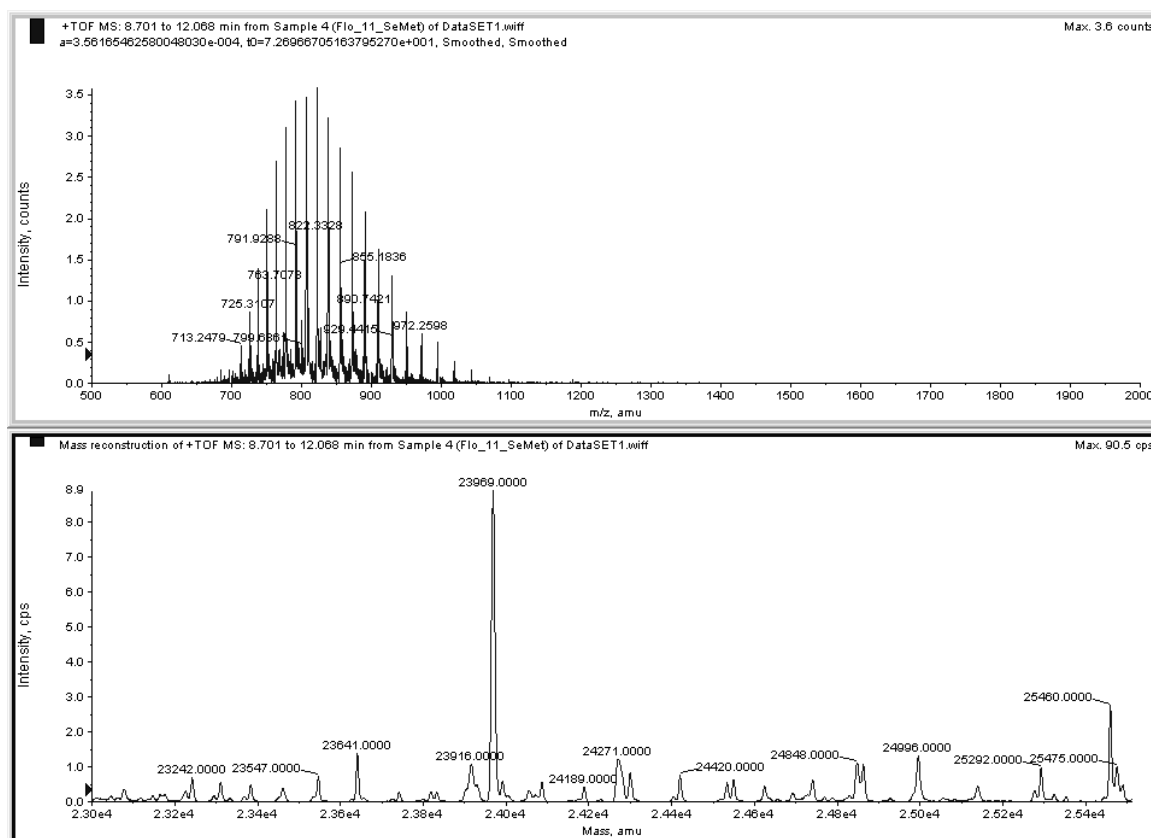
7.1.5 Datensammlungs- und Verfeinerungsstatistiken Flo11A Soaking-Experimente

Tab.7.5: Datensammlungs- und Verfeinerungsstatistiken Flo11A-Soaking-Experimente

Datensatz	MV637	MV636	MV638
Ligand	Mannose	Glucose	GalNAc
Ligand-konzentration	1M	2 M	1 M
Datum	08.11.2010	08.11.2010	08.11.2010
Röntgenquelle	ESRF ID23-1	ESRF ID23-1	ESRF ID23-1
Wellenlänge (Å)	1.7118	1.7118	1.7118
Detektor	ADSC Q315r	ADSC Q315r	ADSC Q315r
Temperatur (K)	100	100	100
Raumgruppe	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁
Zellmaße (Å)			
a	30.4	30.4	30.4
b	54.8	54.9	54.6
c	121.6	121.5	122.0
α, β, γ	90°, 90°, 90°	90°, 90°, 90°	90°, 90°, 90°
Moleküle / a.s.u.	1	1	1
Auflösung (Å)	40.71 – 1.45 (1.53 – 1.45)	32.60 – 1.45 (1.53 – 1.45)	40.74 – 1.40 (1.48 – 1.40)
beobachtete Reflexe	128809	143862	138176
einzigartige Reflexe	36601	36832	40850
Vollständigkeit (%)	99.2 (98.4)	99.6 (98.9)	99.5 (98.3)
Multiplizität	3.5 (3.4)	3.9 (3.7)	3.4 (2.5)
Mittleres I/ σ (I)	8.4 (5.6)	12.4 (6.3)	8.9 (3.7)
R _{merge} (%)	12.3 (18.4)	8.0 (17.6)	10.0 (24.3)
Auflösung	40.71 – 1.45	32.6 – 1.45	30.5 – 1.40
R _{work} (%)	19.1	19.0	19.2
R _{free} (%)	21.9	20.4	20.9
Reflektionen			
work	35034	35650	39489
test	1082	1105	1212
mittlerer B _{wert} (Å ²)	15.3	17.1	16.2
r.m.s.d.			
Bdglänge(Å)	0.027	0.028	0.027
Bdgswinkel (°)	2.22	2.29	2.16

7.2 ESI-TOF-Daten Flo11A-SeMet

Flo11A enthält fünf Methionine. Bei einem Molekulargewicht von 23731 Da für das unmodifizierte Protein, ergibt sich bei vollständiger Modifizierung mit Selenomethionin ein Molekulargewicht von 23966 Da. Bei Massenanalysen des Volllängenproteins wurde eine Masse von 23969 Da gefunden. Dies lässt auf eine vollständige Modifizierung schließen. Der Grund für die Massendifferenz von 3 Da ist unbekannt.



7.3 produzierte und analysierte Proteine

7.3.1 Flo5A

10	20	30	40	50	60
MGSSHHHHHH	SSGLVPRGSH	MSGATEACLP	AGQRKSGMNI	NFYQYSLKDS	STYSNAAYMA
70	80	90	100	110	120
YGYASKTKLG	SVGGQTDISI	DYNIPCVSSS	GTFPCPQEDS	YGNWGCKGMG	ACSNSQGIAY
130	140	150	160	170	180
WSTDLFGEFYT	TPTNVTLEMT	GYFLPPQTGS	YTFSFATVDD	SAILSVGGSI	AFECCAQEQP
190	200	210	220	230	240
PITSTNFTIN	GIKPWDGSLP	DNITGTVYMY	AGYYYPLKVV	YSAVSWGTL	PISVELPDGT
250	260	270			
TVSDNFEGYV	YSFDDDLQS	NCTIPDPSIH			

7.3.2 Epa1A

10	20	30	40	50	60
MGSSHHHHHH	SSGLVPRGSH	MTSSNDISLA	SKDPTTFPLG	CSPDITTPKK	GLSMELYSD
70	80	90	100	110	120
FRKKSYPWCW	DAAYLDPNYP	RTGYKSHRLL	AKVDGVTGNI	NFYHATKGC	TPQLGHLPAS
130	140	150	160	170	180
YNYPKPLTMT	NFTMLLYGYF	RPKVTGFHTF	TISADDLLFV	NFGAGNAFDC	CRRDSSADHF
190	200	210	220	230	240
GNYQAYAIWG	SKTAKDELTV	HLDAGVYPI	RLFYNNREYD	GALSFTFKTE	SNENTVSDFS
250	260				
EYFFSLDDTE	EGCPGLISYD	SS			

7.3.3 LgFlo1A

10	20	30	40	50	60
MGSSHHHHHH	SSGLVPRGSH	MGSTQACLPV	GSRKNGMNVN	FYKYSLQDST	TYSDPQYMA
70	80	90	100	110	120
KYSDTKKLGS	VSGQTHLSIY	YGLNTAFWNT	ASWSSDLFGF	YTTPTNVIVE	MTGYFLPPQT
130	140	150	160	170	180
GSYTFKFATV	DDSAILSVGG	SIAFECCAQE	QPPITSTDFT	INCIKPWDAA	APTDIKGSTY
190	200	210	220	230	240
MYAGYYYPIK	IVYSNAKALA	KLPVSVVLPD	GTEVNDDFEG	YVYSFDDDL	QSNCTIPDPS

KH

7.3.4 Flo11A

10	20	30	40	50	60
MGSSHHHHHH	SSGLVPRGSH	MFPTALVPRG	SSEGTSCNSI	VNGCPNLDFN	WHMDQQNIMQ
70	80	90	100	110	120
YTLDVTSVSW	VQDNTYQITI	HVKGKENIDL	KYLWSLKIIG	VTGPKGTVQL	YGYNENTYLI
130	140	150	160	170	180
DNPTDFTATF	EVYATQDVNS	CQVWMPNFQI	QFEYLQGSAA	QYASSWQWGT	TSFDLSTGCN
190	200	210			
NYDNQGHST	DFPGFYWNID	CDNNCGGTKS	S		

7.3.5 Σ Flo11A

10	20	30	40	50	60
MGSSHHHHHH	SSGLVPRGSH	MFPTALVPRG	SSEGTSCNSI	VNGCPNLDFN	WHMNQQNIMQ
70	80	90	100	110	120
YTLDVTSVSW	VQDNTYQITI	HVKGEENIDL	KYLSSLKIIG	VTGPKDTVQL	YGYDENTDWI
130	140	150	160	170	180
DNPLVSRDE	NTYLIDNPTD	FTATFEVYAT	QDVNSCQVWM	PNFQIQFEYL	QGSAAEYACS
190	200	210	220		
WEWGTTSFYL	STGCDNYDNQ	GYSQTDFFPG	YWNIDCDNNC	APVPTP	

7.3.6 Sun4-C

<u>10</u>	<u>20</u>	<u>30</u>	<u>40</u>	<u>50</u>	<u>60</u>
MGSSHHHHHH	SSGLVPRGSH	NGSIYGDLD	FSGPYEKFED	GTIPCGQFPS	GQGVIPISWL
<u>70</u>	<u>80</u>	<u>90</u>	<u>100</u>	<u>110</u>	<u>120</u>
DEGGWSGVEN	TDTSTGGSC	EGSYCSYAC	PGMSKTQWPS	DQPSDGRSIG	GLLCKDGYLY
<u>130</u>	<u>140</u>	<u>150</u>	<u>160</u>	<u>170</u>	<u>180</u>
RSNTDTDYLC	EWGVDAAYVV	SELSNDVAIC	RTDYPGTENM	VIPTYVQAGD	SLPLTVVDQD
<u>190</u>	<u>200</u>	<u>210</u>	<u>220</u>	<u>230</u>	<u>240</u>
TYYTQWGLKT	SAQYYVNNAG	ISVEDACVWG	SSSSGVGNWA	PLNFGAGSSD	GVAYLSLIPN
<u>250</u>	<u>260</u>	<u>270</u>	<u>280</u>	<u>290</u>	
PNNGNALNFN	VKIVAADDSS	TVNGECIYEN	GSFSGGSDGC	TVSVTAGKAK	FVLYN

7.4 Abkürzungen

Å	Ångstrom ($1 \text{ Å} = 100 \text{ pm} = 10^{-10} \text{ m}$)
Bdglänge	Bindungslänge
Bdgswinkel	Bindungswinkel
C-terminal	carboxyterminal
Da	Dalton, entspricht einer atomaren Masseneinheit. $1 \text{ Da} = 1.660538921 \cdot 10^{-27} \text{ kg}$
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
M	molar (mol/L)
NMR	magnetische Kernresonanz
N-terminal	aminoterminal
n.b.	nicht bestimmt
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PEG	Polyethylenglycol
PMSF	Phenylmethylen-sulfonylfluorid
r.m.s.d.	quadratische Mittelwertabweichung (<i>root mean square deviation</i>)
rpm	Umdrehungen pro Minute (revolutions per minute)
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>sodium dodecyl sulfate</i>)
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan

8 Danksagung

Herrn Prof. Dr. Lars-Oliver Essen möchte ich für die anspruchsvollen Themenstellung, das erwiesene Vertrauen, die hervorragende wissenschaftliche Betreuung dieser Arbeit und allgemein eine tolle Arbeitsumgebung danken.

Herrn Prof. Dr. Hans-Ulrich Mösch danke ich für die freundliche Übernahme des Zweitgutachtens dieser Arbeit und die fruchtbaren Kooperationen bezüglich aller *in vivo* Fragen.

Herrn Dr. Stefan Brückner danke ich für die extrem produktive Kooperation auf dem Flokkulin-Thema, die auch menschlich hervorragend funktioniert hat.

Herrn Dr. Manuel Maestre Reyna danke ich für die Kooperation bezüglich des Epa-Projekts, die Zusammenarbeit bei allen CFG-Angelegenheiten und auch außerhalb des Labors für eine Menge Spaß.

Meinen Diplomanden, Bachelor- und Masterstudenten Michael Kock, Julia Schlereth und Georg Graf zu Eulenburg danke ich dafür, dass es eine interessante und ausfüllende Aufgabe war, sie tiefer in den Kaninchenbau zu führen.

Meinen Vertiefern Barbara Wienen, Elisabeth Martin, Veronika Angerer und Alexander von Tesmar danke ich für die exzellenten Leistungen, die sie auf einigen Teilgebieten dieser Arbeit erbracht haben.

Katrin Anders, Stephan Kiontke, Yann Geisselbrecht, Wolfgang Große, Petra Gnau und Manuel Maestre Reyna danke ich für das Formen des harten Kerns des Labors, Petra natürlich ganz besonders für Asyl in 3701.

Davon abgesehen danke ich natürlich allen jetzigen und ehemaligen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Essen für die tolle Atmosphäre, für viele Erlebnisse innerhalb und außerhalb des Labors und für insgesamt fünf tolle Jahre.

Ein besonderer Dank geht an meine gesamte Familie für die jahrelange Unterstützung in vielerlei Hinsicht, ohne die diese Arbeit sicher nicht zustande gekommen wäre.

